Maio de 1955

Tomo 53

Fascículo 1

COMMONWEALTH INST.
ENTOMOLOGY LIBRARY
21 SEP 1955
SERIAL C.S.A.T
SEPARATE

MEMÓRIAS

DO

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Rio de Janeiro - Brasil

1 9 5 5

SERVIÇO GRÁFICO DO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA

RIO DE JANEIRO

As **MEMÓRIAS**, órgão oficial do Instituto Oswaldo Cruz, são reservadas, exclusivamente, à publicação de trabalhos nêle realizados, e aparecerão em fascículos distintos, de um a quatro, ou em tomos completos, conforme as conveniências editoriais.

Tôda a correspondência deverá ser dirigida à:

Redação das Memórias do Instituto Oswaldo Cruz
Caixa Postal 926 – Endereço Telegráfico: "Manguinhos" Rio
Rio de Janeiro – Brasil

Maio de 1955

Tomo 53

Fascículo 1

MEMÓRIAS

DO

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Rio de Janeiro - Brasil

RIO DE JANEIRO
SERVIÇO GRÁFICO DO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA
1955

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/memorias-do-instituto-oswaldo-cruz_1955-05_53_1

Indice

Tomo 53 Ano 1955 Fasciculo 1

NERY-GUIMARÃES, F. — Estudo de um foco de Leishmaniose mucocutânea na Baixada Fluminense (Estado do Rio de Janeiro) 1

DIAS, EMMANUEL & DAWOOD, MOHAMMED M. — Preliminary trials on the biological snail control with *Bacillus Pinottii* in Egypt 13

PACHECO, GENESIO — Dermatobrucelosen 31

PACHECO, GENESIO & DIAS, VINICIUS MOREIRA — Contribution to the normal fecal flora of the hamster. *Proteus mirabilis* in normal feces of hamster 41

MELLO, MILTON THIAGO DE — A simple micro-incinerator 43

MELLO, MILTON THIAGO DE & SILVA, NIBER PAZ M. — The use of triphenyltetrazolium chloride in the study of dehydrogenase activity of *Brucellae* 45

NERY-GUIMARÃES, F. — Sensibility of the hamster (*Cricetus auratus*) to the *Treponema pertenue* 59

BARTH, RUDOLF & LACOMBE, DYRCE — Estudos anatômicos e histológicos do ducto intestinal de *Embolyntha batesi* MacLachlan, 1877 (Embiidina) 67

PARAENSE, W. LOBATO & DESLANDES, NEWTON — Observations on the morphology of *Australorbis glabratus* 87

COSTA, GOBERT ARAUJO & VERNIN, CARLOS SOLÉ — Sôbre u'a modificação do meio de Monteverde 105

COSTA, GOBERT ARAUJO, ALMEIDA, WASHINGTON AUGUSTO DE & SILVA, NIBER DA PAZ MOREIRA DA — Tipos fermentativos do bacilo tífico 115

PARAENSE, W. LOBATO & DESLANDES, NEWTON — Observations on the morphology of *Australorbis nigricans* 121

LENT, HERMAN & WYGODZINSKY, PETR — Espécies de *Zelurus* Hahn e *Opisthacidius* Berg de Colômbia, Ecuador e Peru (Reduviidae, Hemiptera) 135

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo 53 Fascículo 1 Maio de 1955

Estudo de um foco de Leishmaniose muco-cutânea na Baixada Fluminense (Estado do Rio de Janeiro)*

F. Nery-Guimarães
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D.F.

(Com 11 figuras no texto)

A existência da leishmaniose muco-cutânea na Baixada Fluminense é fato conhecido desde longa data. Motiva a presente comunicação o estudo de um foco observado em Suruí, vila pertencente ao município de Magé, foco êsse que apresentou um caráter epidêmico. O trabalho foi realizado em 1947, tanto no local como no Instituto Oswaldo Cruz, em cujo Hospital Evandro Chagas vários pacientes foram internados.

ALGUNS DADOS SÔBRE A REGIÃO

Embora pertença à Baixada Fluminense, a zona estudada encerra morros e colinas; é cortada pelo rio Suruí que deságua na baía de Guanabara; e possui trechos florestais com apreciável fauna de mamíferos silvestres. O clima é quente e úmido com chuvas abundantes e freqüentes.

Na Vila de Suruí (que é sede de Distrito), se reunem cêrca de 30 casas e, aproximadamente, uma centena de outras habitações rústicas do tipo "cafúa" se distribuem irregularmente nas encostas dos morros, à beira do rio e em plena mata, sendo ligadas entre si por meio de caminhos e picadas. A população, constituída em parte de negros e mestiços, em geral se dedica a tarefas agrícolas, pequena pecuária e indústria extrativa, inclusive o fabrico de carvão vegetal. Para isso fazem-se derrubadas periódicas. Aliás, no ano anterior, meses antes do inquérito, tinha sido feita uma derrubada de grandes proporções. A alimentação é deficitária para mais de 2/3 da população. Das doenças encontradas

---

* Um resumo dêste trabalho foi apresentado ao VI Congresso Internacional de Microbiologia, reunido em Roma, em setembro de 1953.

na região, figurava em primeiro plano a malária (hoje pràticamente extinta, graças aos recentes trabalhos de profilaxia pelo DDT). Outras endemías reinantes são a ancilostomíase, a tuberculose e a blastomicose. A escabiose é muito difundida.

OBSERVAÇÕES CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS

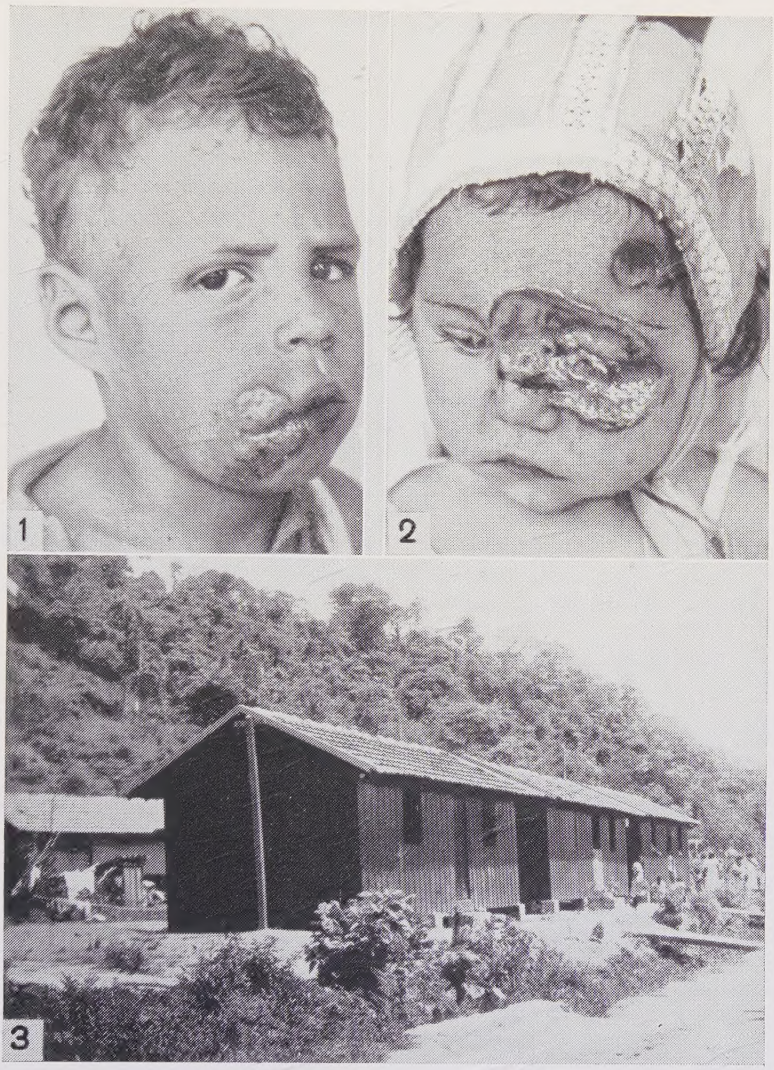
Os trabalhos foram realizados, principalmente, no primeiro trimestre de 1947, e obedeceram a um plano visando os fatôres epidemiológicos essenciais: doentes, depositários e transmissores.

Foram cadastradas 306 pessoas (cêrca de 50% da população), distribuídas em 76 casas; 12 outras visitadas, estavam desocupadas. Obteve-se, assim, uma demografia domiciliária de 4,0. Foram encontrados 48 indivíduos com ulcerações, 39 dos quais (ou seja 12,7% dos examinados) eram casos de leishmaniose. Os restantes eram portadores de "ulcus tropicum" e outras lesões devidas a traumatismos, tais como queimaduras e golpes de instrumentos agrícolas. Dos 39 casos de leishmaniose, 29 foram diagnosticados pelo encontro direto do parasito, 4 pelo isolamento em culturas em meios apropriados (NNN e Noguchi), e 6 tiveram o seu diagnóstico baseado na clínica, epidemiologia, imunobiologia e terapêutica. Foram encontrados 47 indivíduos com cicatrizes, 24 delas suspeitas de leishmanióticas e as restantes devidas a outras causas. Das cicatrizes suspeitas (predominantes nas partes descobertas do corpo), 21 tiveram o diagnóstico confirmado pela reação de Montenegro, cujos resultados foram os seguintes: positiva fraca (++) — 6; positiva (+++) — 12; e positiva forte (++++) — 3. Algumas dessas cicatrizes datavam de 5 a 15 anos, inclusive 7 que deram resultados positivos (+++) e uma que deu reação fortemente positiva (++++).

Nos domicílios foi feita captura manual crepuscular de flebótomos, que são chamados localmente "caravelos". Tôdas as 12 casas pesquisadas foram positivas, apanhando-se um total de 136 flebótomos (11,3 por casa). Todos pertenciam à espécie *P. intermedius*. Esta mesma espécie foi encontrada também fora dos domicílios, ao lado de exemplares avulsos de espécies silvestres, aparentemente sem importância epidemiológica. Os moradores foram unânimes no informe de que antes da derrubada florestal, que se iniciara em junho do ano anterior, os flebótomos não eram tão abundantes dentro das casas.

Procurou-se também a enfermidade em animais domésticos. Assim, de 23 cães examinados, apenas um foi encontrado com lesões suspeitas nas orelhas. A pesquisa de leishmanias nos esfregaços e cortes foi negativa, mas a histopatologia era muito sugestiva e a intradermo-reação mostrou-se duvidosa (+). Na casa a que pertencia êsse animal foram encontrados 5 casos da doença, de modo que é muito provável que as lesões nela assinaladas fossem leishmanióticas. Também, de 15 gatos examinados, foi encontrado um com lesões ulcerativas na cabeça. Mas, neste animal também foi negativa a pesquisa direta de leishmanias, e não foram feitos cortes nem a intradermo-reação.

Foram examinados, ainda, com resultados negativos os seguintes animais silvestres: 3 tatus (*Dasypus novemcinctus*), 2 cotias (*Dasyprocta agouti*), 5 gambás (*Didelphis aurita*), 6 preás (*Cavia aperea*?) e 12 ratos não determinados.



Figs. 1 e 2 — Irmãos com lesões leishmanióticas muco-cutâneas; curados, restando deformações cicatriciais. Fig. 3 — Domicílio de doentes no foco, vendo-se ao fundo a mata desbastada.

Dos 39 pacientes, 4 mostraram lesões mucosas (10,3%): nasais — 2, oral — 1 e conjuntival — 1. Lesões únicas foram encontradas em 23 pacientes e lesões múltiplas em 16 (41,0%). Relacionando-se a multi-

plicidade de lesões ao tempo de doença (Quadro I), constata-se a sugestão de que ela resultaria principalmente de propagação linfática ou sanguínea, e em menor escala da concomitância de infecções. Apenas 5 indivíduos com lesões múltiplas acusavam o aparecimento concomitante de 2 ou 3 lesões; nos restantes, estas tinham cronologia diferente. O maior número de lesões encontradas no mesmo paciente foi de 6.

QUADRO I

Distribuição das lesões por tempo de doença

TEMPO DE DOENÇA	Lesões únicas	Lesões múltiplas	Totais
Menos de 1 mês.....	3	0	3
1 mês.....	6	1	7
2 a 3 meses.....	7	7	14
4 » 6 »	3	4	7
7 » 11 »	2	3	5
1 ano e mais.....	2	1	3

QUADRO II

Distribuição etaria dos casos

GRUPOS ETÁRIOS	Número de casos	%
De 1 a 10 anos.....	14	35,9
» 11 » 20 »	12	30,8
» 21 » 30 »	6	15,4
» 31 » 40 »	3	7,6
» 41 » 50 »	3	7 6
» 51 » 60 »	1	2,6

A distribuição das lesões no corpo, mostra a absoluta predominância do seu aparecimento nas partes expostas, justamente de acôrdo com a transmissão por vetor hematófago e alado. Assim, temos: cabeça — 15, tronco — 8, membros superiores — 15 e membros inferiores — 28.

Dos 39 pacientes, 20 eram homens e 19 mulheres. Esta igualdade de distribuição entre os sexos não é comumente referida. Êste fato decorre, entretanto, da franca ocorrência, no foco em aprêço, da transmissão domiciliária, conforme se depreende também da distribuição pela idade (Quadro II), segundo a qual se verifica a infecção elevada de crianças de ambos os sexos menores de 10 anos, algumas mesmo no primeiro ano de vida.

A distribuição quanto ao tempo de doença (Quadro I) sugere francamente a existência de um "ano epidêmico", ainda que demonstre a endemia, já comprovada pelo encontro de cicatrizes. Naturalmente, deve ser ressalvado que o tempo de doença referido pelos pacientes ou circunstantes, não é precisamente exato. Têm, todavia, valor aproximado da realidade, máxime nos casos de menos de 6 meses.

Para termos a época provável da infecção, basta relacionarmos a data em que o paciente foi encontrado, com o tempo de doença referido acrescentado de 2 meses (período médio de incubação). Verificou-se dêste modo, que a infecção se dera principalmente entre julho e dezembro, inclusive, do ano anterior, seguindo-se, portanto, à derrubada florestal que começara em junho. Nesses 5 meses ocorrêra, provàvelmente, a infecção de 31 pessoas que tinham menos de 7 meses de doença.

Foram feitas intradermo-reações em 36 casos, empregando-se antígeno de "leptomonas" de culturas de *L. brasiliensis*. Na face interna do antebraço esquerdo de cada indivíduo, era injetado 0,05 ml de antígeno; e a mesma dose era injetada em um "testemunha" para cada gru-

po de 5 doentes. Os resultados foram lidos de acôrdo com o seguinte critério: *negativa* (0) — nenhuma reação local, depois de 48 horas; *duvidosa* (±) — pequena pápula eritematosa permanecendo depois de 48 horas; *positiva fraca* (++) — pápula eritematosa de 1 cm de diâmetro;

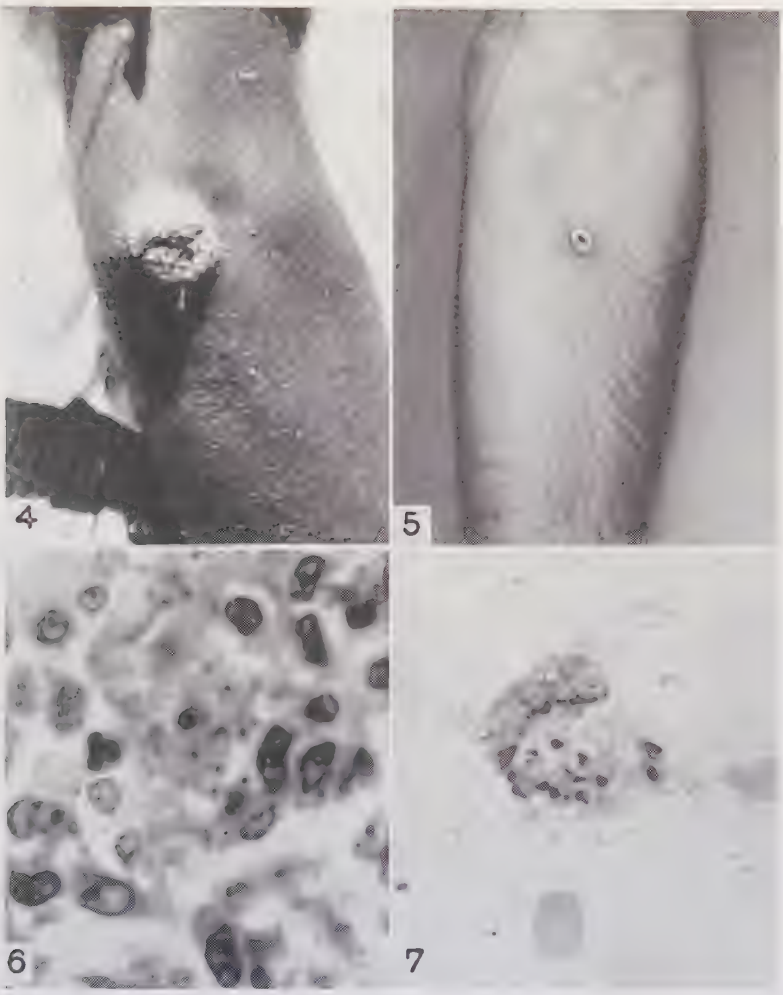


Fig. 4 — Rapaz de 17 anos com lesão cutânea úlcero-infiltrativa. Fig. 5 — Reação de Montenegro fortemente positiva (++++): necrose e ulceração. Fig. 6 — Corte de lesão cutânea com leishmanias. Fig. 7 — Macrófago com leishmanias em esfregaço (Giemsa) de lesão ulcerosa.

positiva (+++) — pápula medindo mais de 1 cm de diâmetro e com larga zona de eritema; e, finalmente, *positiva forte* (++++) — grande pápula e eritema extenso, seguindo-se de vesiculação e necrose. Os resultados fornecidos pelos 36 pacientes, foram os seguintes: reações du-

vidosas — 2; fracamente positivas — 12; positivas — 16 e fortemente positivas — 6.

Sob o ponto de vista clínico, as lesões encontradas se distribuíam do seguinte modo: *a*) das 4 lesões mucosas, 2 eram úlcero-infiltrativas e 2 eram úlcero-destrutivas; *b*) as 69 lesões cutâneas assim se distribuíam: lupóide — 1, ectimatóides — 5, impetiginóides — 11 e ulcerosas — 52.

TERAPÊUTICA

Foram tratados 26 pacientes, sendo 18 com tártaro emético, 4 com "fuadina" e 4 com ambos os medicamentos associados. As injeções de tártaro eram feitas uma ou duas vêzes por semana, em doses progressivas até 10 cc. Por causa dos fenômenos tóxicos provocados, essa periodicidade das injeções foi por várias vêzes dilatada, tendo-se em 2 casos de suspender o tratamento. As manifestações acusadas pelos doentes foram náuseas, zumbido nos ouvidos, estado vertiginoso e tosse, além de vômitos (2 casos) e vertigem (1 caso). Êsses fenômenos tóxicos, em geral, ocorreram depois da terceira à sexta injeções. Crianças tomavam 1/4, 1/3 ou 1/2 da ampola de 10 cc, de acôrdo com a idade. Em todos os casos, menos 2, obteve-se cicatrização das lesões. Nos casos curados, o total de injeções variou de 6 a 17. Do mesmo modo, foi obtida a cura dos casos tratados com "fuadina", a qual não determinou fenômenos tóxicos. Também era aplicada 2 vêzes por semana, apenas os adultos recebendo o conteúdo inteiro de cada ampola. Dos 4 tratados com ambos os medicamentos, apenas 2 ficaram completamente curados. Os outros 2, que apresentavam lesões da mucosa nasal, tiveram sensíveis melhoras, mas não foram à cura definitiva.

Foi observada a cura expontânea de 3 casos com lesões ulcerosas únicas nos membros.

OBSERVAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E IMUNOBIOLÓGICAS

Foram feitas biópsias de 18 lesões, em número correspondente de indivíduos. Os achados histopatológicos podem ser assim resumidos. Na *epiderme* era constante a hiperacantose mais ou menos pronunciada, sendo freqüentes os aspectos pseudo-epiteliomatosos e a formação de globos córneos; ocorria também, às vêzes, hiperqueratose e paraqueratose, assim como exoserose, exocitose e microabcessos; nas zonas ulceradas, com maior ou menor destruição da epiderme, uma crosta fibrino-purulenta recobria diretamente a derme. Na *derme*, um quadro freqüente e característico era um infiltrado de células redondas, principalmente plasmócitos, o qual, se estendia largamente, envolvendo vasos e glândulas, não existindo muitas vêzes nenhum outro elemento celular de permeio; outras células reconhecíveis no infiltrado eram polimorfonucleares e histiócitos; os vasos sanguíneos e linfáticos eram dilatados e de endotélios tumefeitos; na base das ulcerações havia fibrina, piócitos, necrose e, mais profundamente microabcessos. Outro quadro também

característico da derme, era a ocorrência de uma reação granulomatosa com células epitelióides e gigantes. Essa granulomatose, geralmente difusa, ocorria também com nódulos circunscritos, justapostos a vasos

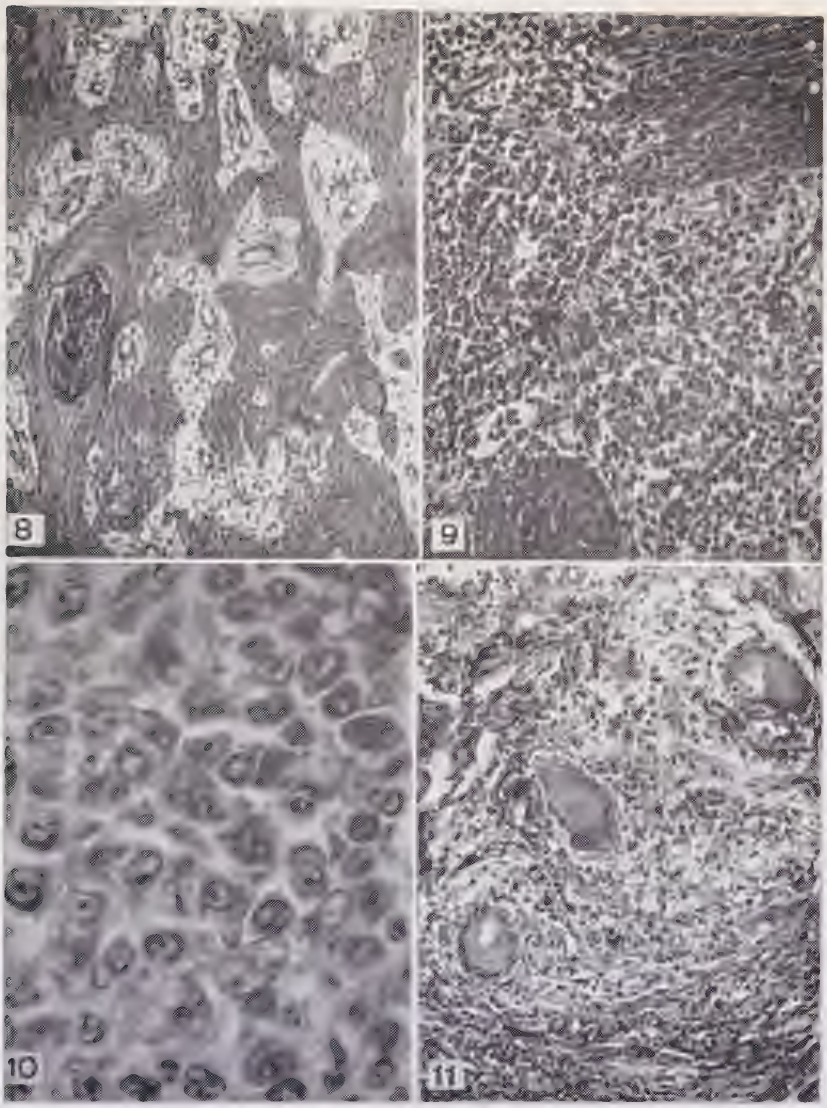


Fig. 8 — Pseudoepiteliomatose em lesão cutânea. Fig. 9 — Infiltração monocítica da derme (outro corte). Fig. 10 — Infiltração por células plasmáticas. Fig. 11 — Granulomatose; infiltração giganto-histiocitária.

e glândulas. Em geral, nos casos iniciais da doença, a granulomatose era muito rara, estando a infiltração de células plasmáticas isolada e, nos casos antigos, embora permanecesse o infiltrado, aparecia e por fim

predominava francamente a granulomatose. Êste aspecto era particularmente notável na lesão de natureza lupóide.

Para comparar o infiltrado e a granulomatose, dividimos as biópsias em 2 grupos: *i*) biópsias de indivíduos com menos de 3 meses de doença; *ii*) biópsias de indivíduos com 3 meses e mais de doença. No primeiro grupo, de 8 biópsias, apenas 2 (25%) apresentavam reação granulomatosa; e no segundo grupo, de 10 biópsias, 9 (90%) apresentavam essa reação. Verificou-se, entretanto, no conjunto, que, por um lado, 2 indivíduos com 1 e 2 meses de doença, já apresentavam essa reação granulomatosa, e por outro lado, um indivíduo com 7 meses de infecção ainda não a apresentava.

Essa granulomatose, em verdade, parece representar um estado hiperérgico do organismo em presença da infecção leishmaniótica. Por outro lado, o quadro histológico em geral — dentro da relatividade biológica — está muito estreitamente ligado à imunobiologia. Com efeito, no "grupo de menos de 3 meses de doença", os 2 indivíduos que apresentaram a granulomatose deram respostas positivas (+++) à intradermo-reação; enquanto os 6 restantes, que não apresentaram êsse tipo de reação tissular, responderam à intradermo-reação de modo duvidoso (+) ou fracamente positivo (++). Ao contrário, o único indivíduo do grupo de "3 meses e mais de doença" que não apresentava a granulomatose, reagiu fracament e(++) à intradermo-reação; enquanto os 9 restantes (todos apresentando a granulomatose) reagiram de modo positivo (+++) ou fortemente positivo (++++). As observações sugerem, portanto, em suas linhas gerais, que a granulomatose traduz uma hiperergia que, por sua vez, se traduz imunobiològicamente pela maior intensidade das respostas à intradermo-reação de Montenegro. Reação granulomatosa e hiperergia estão na relativa dependência do tempo de doença. Assim, estudando comparativamente êsses dois fenômenos biológicos nos 18 casos nos quais foram feitas biópsias, temos no Quadro III os mesmos divididos em 3 grupos, segundo o tempo de doença.

QUADRO III

Distribuição dos casos com intradermo-reação e com granulomatose, de acôrdo com o tempo de doença

TEMPO DE DOENÇA	Número de casos	INTRADERMOREAÇÃO				GRANULOMATOSE	
		+ ou ++	%	+++ ou ++++	%	Nº	%
Até 2 meses.....	8	6	75	2	25	2	25
De 3 a 9 meses...	6	3	50	3	50	5	83
De 1 ano e mais..	4	0	-	4	100	4	100

Verifica-se claramente que, tanto a intensidade da intradermo-reação, como principalmente a ocorrência da reação tissular granulomatosa, crescem ràpidamente com o tempo de doença.

No que diz respeito à presença de leishmanias, elas não se mostraram muito numerosas em nenhuma das biópsias, nem mesmo naquelas cujos esfregaços sugeriam riqueza de parasitos. De um modo geral, nas lesões mais recentes era muito mais fácil o seu encontro. Por outro lado, as leishmanias eram raras em meio à reação granulomatosa. Isoladas ou agrupadas, elas estavam incluídas no plasma de macrófagos (histiócitos) espalhados entre as células infiltrativas.

Cinco anos depois dêste inquérito constatou-se pràticamente a extinção dêste foco de leishmaniose. Durante êsse tempo tinham sido feitas aspersões periódicas com DDT para combate à malária.

RESUMO E CONCLUSÕES

O trabalho refere as observações feitas em 1947 em um foco de leishmaniose muco-cutânea na Baixada Fluminense (Estado do Rio de Janeiro, Brasil). A existência da moléstia como uma endemia na região foi comprovada pelo encontro de 21 cicatrizes típicas, reagindo positivamente à intradermo-reação com antígeno específico, algumas datando de 5 a 15 anos. Na época dos trabalhos, entretanto, foi constatado um "surto epidêmico", o qual coincidira com uma grande derrubada florestal para fabrico de carvão vegetal. De 306 pessoas examinadas (cêrca de 50% da população local), foram encontradas 39 com lesões leishmanióticas (12,7%). Dentro e fora dos domicílios foram capturados *Phlebotomus intermedius*. Em 12 casas foram coletados 136 exemplares (11,3 por casa). De 23 cães examinados foi encontrado um com diagnóstico provável da moléstia. Quinze gatos examinados mostraram-se negativos e, do mesmo modo, 28 mamíferos silvestres de pequeno porte. Dos 39 pacientes, 4 tinham lesões mucosas (10,3%); 16 apresentavam lesões múltiplas (41,0%); e 19 eram mulheres (48,7%). Havia absoluta predominância das lesões nas partes descobertas do corpo. Cêrca de 1/3 dos casos era em crianças até 10 anos, atestando uma intensa transmissão domiciliária. Existiam casas com 2 a 6 enfermos. Com base nos informes dos pacientes ou responsáveis quanto ao tempo de doença (e admitindo-se um período incubativo médio de 2 meses), concluiu-se que, provàvelmente, a grande maioria das infecções se dera entre julho e novembro, coincidindo com a derrubada florestal acima citada. Em 36 casos foi feita a intradermo-reação de Montenegro, obtendo-se respostas duvidosas em 2 e positivas em 34, com intensidade variável. Foram feitas 18 biópsias. Na epiderme havia hiperacantose e, freqüentemente, pseudoepiteliomatose com globos córneos e microabcessos; e na derme observaram-se 2 quadros característicos: ou um infiltrado de plasmócitos predominantes, ou uma reação granulomatosa, os quais, às vêzes, se associavam. Em geral, a granulomatose ocorria nos casos mais antigos, isolada ou associada à infiltração, que predominava nos casos mais recentes da enfermidade. A granulomatose traduziria um estado hiperérgico do organismo, uma vez que os indivíduos que a apresentaram tinham maior tempo de doença e reagiam fortemente à intradermo-reação. As leishmanias nunca se mostraram muito

numerosas nos cortes estudados. Em 3 pacientes foi observada cura espontânea. Foram tratados 26 doentes, sendo 18 com tártaro emético, 4 com "fuadina" e 4 com ambos os remédios. O tártaro mostrou-se tóxico, embora desse resultados tão bons quanto a "fuadina". Dois pacientes com lesões da mucosa nasal não se curaram completamente, não obstante terem recebido ambos os remédios.

Cinco anos depois dêste inquérito constatou-se pràticamente a extinção dêste foco de leishmaniose. Durante êsse tempo tinham sido feitas aspersões domiciliárias periódicas com o DDT para combate à malária (Nery Guimarães & Bustamante, 1953).

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The paper reports a survey made in a focus of muco-cutaneous leishmaniasis in a locality of the lowlands of the State of Rio de Janeiro, Brazil (Baixada Fluminense). The existence of the disease as an endemic of the region was confirmed by the finding of 21 cases with typical scars and responding positively to Montenegro's intradermo-reaction with specific antigen and some of them dating back from 5 to 15 years. At the time of the survey, however, an epidemic outbreak was discovered, coinciding with a great felling of trees for the making of charcoal. Out of 306 persons examined (50% of the local population), 39 presented leishmaniotic lesions (12,7%). Both within the houses and outside, adults *Phlebotomus intermedius* were captured. From 12 houses, 136 specimens were captured (11,3 per house). Out of 23 dogs examined, one was found with a probable diagnosis of leishmaniasis. Fifteen cats were found negative, as well as 28 small wild mammals. From the 39 patients, 4 had mucous lesions (10,3%), 16 presented multiple lesions (41,0%), and 19 were female (48,7%). There was an absolute predominance of lesions on bare parts of the body. About one third of the cases were children of 10 years or less, confirming the intense domiciliary transmission. Some houses had 2 to 6 patients. On basis of information furnished by the patients or by their relatives as to the time elapsed since the beginning of the infection, and admitting an incubation period of 2 months, it is possible to conclude that the great majority of infections probably occurred between July and December, coinciding with the great felling of trees already referred to. In 36 cases Montenegro's intradermo-reaction was made, with 2 doubtful and 34 positive results of variable intensity. Eighteen biopsies were made, the epidermis presenting hyperacanthosis, and frequently pseudoepitheliomatosis with corneous globules and micro-abscesses. The dermis showed two characteristic pictures: an infiltration with predominance of plasmocytes or a granulomatous lesion with epithelioid and giant cells. In general, granulomatosis occurred in older cases, isolated or associated to infiltration with plasmocytes. It seems that granulomatosis represents a hyperergic condition of the infected organism, as the patients who showed it had the disease for a longer time and responded strongly to the intradermo-reaction. Leishmaniae were not numerous

in sections. Three patients showed spontaneous cure. Twenty six patients were treated, 16 with tartar emetic, 4 with "fuadin" and 4 with both these drugs. Some of the patients treated with tartar showed toxic symptoms, although the results were as good as those obtained with "fuadin". Two patients with nasal mucous lesions were not cured, notwithstanding the use of both these drugs.

Five years after this survey, muco-cutaneous leishmaniasis was absent from the region, probably as a consequence of several periodical DDT house sprayings to combate malaria during the intervening years (Nery Guimarães & Bustamante, 1953).

REFERÊNCIA

Nery-Guimarães, F. & Bustamante, F.M., 1953, DDT House Spraying as a Basis for the Control of Leishmaniasis. *V International Congress of Tropical Medicine and Malaria,* 28th August-4th September. Istambul, Turkey.

Preliminary trials on the biological snail control with *Bacillus Pinottii* in Egypt

Emmanuel Dias and **Mohammed M. Dawood**
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil
Research Institute, Cairo, Egypt

(With 10 text-figures)

Soon after starting his researches on the possibilities of the snail control by microbiological methods, Dias (1953*a*) succeeded in isolating from *Australorbis glabratus* from Bambui, Brazil, the local intermediate host of *Schistosoma mansoni,* a spore-bearing bacillus, conventionally called BET (*bacilo de espóro terminal*). In that paper he described 1) the procedure he had been using in attempting to increase the virulence of microorganisms against snails, through repeated passages from snail to snail, 2) the method for isolating bacteria from the ovotestes of living snails, and 3) the preliminary results of the first experiments that were carried out in small breeding places in the field. In a paper read before the V International Congresses on Tropical Medicine and Malaria, held at Istanbul in August-September 1953, Dias (1953*b* 1954*a*) reported the encouraging results he had obtained in Bambui, by treating large breeding places with BET cultures to which powdered peptone was added.

BET bacillus proved to be an apparently new species, which has been named *Bacillus pinottii* Cruz & Dias, 1953; it is a proteolytic aerobic organism that was found to be harmless to several species of vertebrates and, under certain conditions, lethal to *A. glabratus* and other South American molluscs.

Schistosomiasis is considered to be the number one public health problem in Egypt. It is known that it occurs there since pharaonic times and that its incidence is increasing with the improvement of the irrigation system and the development of agriculture. There are there two forms of the human disease, viz., intestinal schistosomiasis due to *Schistosoma mansoni,* which is prevalent in the Delta of the Nile river, and urinary schistosomiasis, caused by *S. haematobium,* which occurs in the Delta as well as in Upper Egypt. About 60 per cent of the population is affected either by one or by both forms of the disease. Snails of several species thrive in the drains, canals, ponds, ditches and other breeding places along the Nile valley: the most important are *Bulinus*

truncatus, the intermediate host of *S. haematobium*, and *Planorbis boissyi*, the vector of *S. mansoni; Bulinus, Lymnaea* and others are also important from the veterinary point of view, as carriers of animal parasites, such as *S. bovis* and *Fasciola gigantica*.

An opportunity for trying the effect of *B. pinottii* on Egyptian snails would thus be most desirable, notwithstanding the fact that research work on this new line was just beginning. Such opportunity was offered last year, soon after the senior author attended the Congresses at Istanbul: he was able to spend nearly three months in Egypt and to carry on with Dawood the experiments that are reported in the present paper. The work has been done at the Research Institute (Director Dr. A. Halawani), from the Ministry of Health (Minister Dr. Nourredine Tarraf). Thanks to a suggestion from Prof. E. Rodenwaldt, from Heidelberg, the writers had been corresponding for some time before meeting each other in Cairo.

Acknowledgements — The writers wish to express their best thanks to Dr. Mario Pinotti, Director of the National Malaria Service from Brazil, for making possible the trip of one of them to Egypt, and to the following Egyptian authorities and technicians, for the help and facilities they have provided for the present work: Dr. Nourredine Tarraf, Minister of Public Health, Dr. A. Halawani, General Director of Endemic Diseases Control & Research, Dr. M. Gindi, from the Snail Destruction Section, Drs. Anwar and Nasr, from the Research Institute.

CULTIVATING *BACILLUS PINOTTII* ON DIFFERENT MEDIA

B. pinottii, or BET bacillus as it has been previously referred to (Dias), originally isolated from *A. glabratus* from Bambui, Brazil, has been recently described by Cruz & Dias. It is a Gram variable, aerobic, motile Bacillus, bearing a terminal spore (*plectridium*). Some of its characteristics, according to Cruz & Dias:

Broth — Rapid grow at pH 7,0-7,2, the pH of the medium raising after some days of culture, reaching sometimes pH 9,0; no growth under pH 5,0. Abundant sediment, forming sometimes a thin pellicle. Optimum temperature 25°-37°, no growth at 50° C. *Agar slant* — Thick smooth, glistening, white-yellowish growth. Salt tolerant. *Gelatin stab* — Rapid liquefaction, infundibuliform. *Litmus milk* — No coagulation; peptonization; litmus reduced. *Cooked egg-albumin* — Peptonized, odour of putrefaction. *Blood agar* — Hemolysis in 48 hours. *Carbohydrate media* — No acid nor gas. *Indol* — Positive. *Acetyl-methyl-carbinol* — Negative. *Methyl-red test* — Negative. *Nitrates* — Not reduced. *Starch* — Not hydrolized. *Citrate medium* — No growth. *Ammonia* — Produced. *Urea* — Not decomposed. H^2S — Not produced.

Bacilli morphologically similar to *B. pinottii* have been isolated from *P. boissyi* in Cairo by the writers.

For ordinary purposes for laboratory and field work *B. pinottii* may be cultivated on ordinary meat-extract broth or just in 1% peptone water. Since peptone is not commercially produced in Egypt and the imported product is very expensive in that country, we decided to try

to cultivate the *bacillus* on several cheap media. The experiments that were made in Egypt with peptone cultures were made possible since we received materials that had been shipped from Rio de Janeiro by the National Malaria Service, thanks to the Director, Dr. Mario Pinotti.

Cattle's blood — This material can be bought cheaply from the slaughter house in Cairo. It was brought to the laboratory in sterile vessels after being collected from the carotid artery of the slaughtered

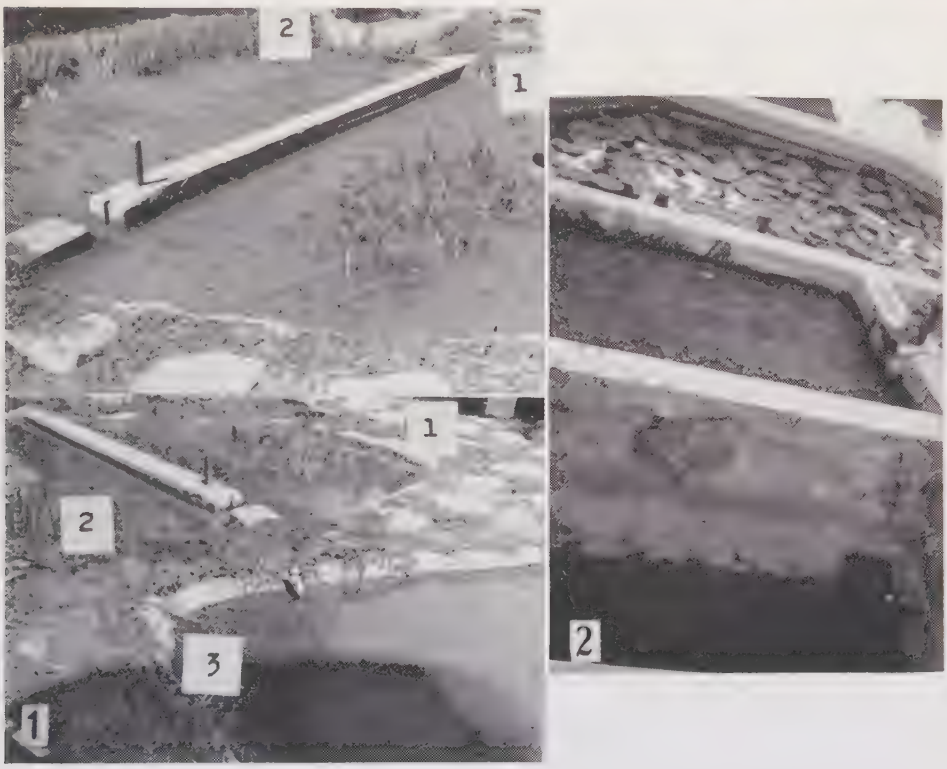


Fig. 1 — Pool at the Snail Destruction Section (experiment 5); fig. 2 — pool at the Research Institute (experiment 6).

animal. Dilutions of 1, 5, 10 and 20 per cent of whole blood in tap water were prepared in sterile vials; to these and to equivalent dilutions, to which traces of peptone were added, the bacillus was inoculated and the vials were kept at 37° for 24-48 hours. Good, pure culture of the bacillus developped in all dilutions, either with and without traces of peptone; it was more abundant after 48 hours and in the higher blood concentrations, so, for experimental purposes, concentrations from 5 to 20% or more may be used. For several reasons we tried to cultivate *B. pinottii* on cattle's boiled blood. For comparison, two flasks with 5% blood each were prepared and one of them was boiled for

several minutes. Both were inoculated with the same amount of culture and the growth appeared to be better on boiled blood. So we advise boiling the blood, a procedure that offers more than one advantage. In fact, not only less care may be exercised in collecting and transporting blood, since less contamination is expected if it is to be boiled, but also the application of the culture in the field will be better accepted by people if it is made on boiled blood, which shows a less repugnant appearance than the cultures on fresh blood.

Yeast — Used yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) may be obtained freely from beer factories, or at low cost (100 kg of liquid or pressed yeast cost respectively 1 and 3 Egyptian pounds). Dried yeast contains 60-70% proteins. Ten per cent liquid yeast in tap water was tried as a culture medium for BET bacillus but it was found that, although some growth developped, it was inferior to the one that takes place on peptone or blood cultures. Both living and dead yeast were tried. Growth is improved by the addition of peptone.

Laboratory-made peptone — We prepared it in the usual way (1 litre tap water, 300 g cleaned, minced stomach, 100 cc hydrochloric acid, etc.) (cf. Hook & Fabian, 1943) using stomachs from pig, sheep and cattle. Good cultures were obtained in media prepared with such peptones.

ANIMAL EXPERIMENTS

Although previous experiments, carried out in Brazil, had shown that *B. pinottii* was harmless to dogs and guinea pigs, either by inoculation, *per os* or by rubbing cultures on the skin, some more experiments were performed in Cairo:

One cock was given 5cc of peptone culture by mouth for two consecutive days. One dog (11 kg) took 100 cc by mouth twice a day for two days and then once a day for two more consecutive days. The animals did not show any ill effects during an observation period of two months. Blood was taken from the dog's vein one week after it started to be fed with cultures and was inoculated into culture media, which remained sterile.

Twelve gerbils were given by mouth 1 cc culture once a day for three consecutive days. A pregnant female died on the third day, but post mortem examination did not show any significant changes and typical bacilli were not found in smears from different organs. Another gerbil died on the 7th day, but cultures from heart blood were negative for *B. pinottii*. The nine other animals remained alive and healthy for over two months.

Culture was rubbed on the shaved and scratched skin of a guinea pig's abdomen, and was applied to the wounded skin of a gerbil: no further lesions developped and the wounded skin of the animals healed quickly. Pure culture was dropped in the eye of a dog and a gerbil, and no harm was noticed.

Mortality of fish and other vertebrates and invertebrates (excluding molluscs) has never been observed in Brazil in waters treated with *B pinottii* cultures and small amounts of peptone.

Fig. 3 — Transportation of cultures in drums for the drain near the Pyramids (experiment 7); fig. 4 — preparing a partition of a drain with a mud and stone wall (experiment 7).

People working with the bacillus in the field for a long time, taking no special precautions, did not show any ill effects. Peptone used to be dissolved into cultures with bare hands. The writers and their helpers have been doing so and besides they have taken incidentally small amounts of culture into the mouth, but no harm was ever noticed.

EXPERIMENTS ON SNAILS

a) In the laboratory and in artificial pools

1 — A thick fluid (prepared some weeks previously by mixing powdered peptone with a culture of *B. pinotii* 1:1) was added to water containing snails in a vial, at a concentration of 1:50. After 24 hours, 73,3% of *P. boissyi* and 93,3% of *B. truncatus* were dead. After 3 days all snails were dead, while in the control vials a good number of them were living.

2 — Some *Bulinus* and *Planorbis* remained for 24 hours in water containing bacilli and peptone. After that, the dead and living ones were transferred to another jar containing just water, where they all died in three days. The water became turbid and presented the characteristic odour, while in the control it remained more or less clear. For several days the turbid water of the experiment jar was examined and found to be swarming with typical bacilli and spores.

3 — A paste of peptone and culture (as in 1) was diluted from 1:10 to 1:10 million in several glasses containing living *Planorbis* and *Bulinus*. At the end of 7 days all snails were dead, except in the last dilution, in which 50% of *P. boissyi* were living; in the controls the snails remained alive. Dead snails were not removed from the glasses. Microscopic examination showed that BET bacilli were present in the different dilutions, and were more abundant in the higher concentrations. No typical bacilli were seen in the water of the control vial.

This last experiment has been repeated in two series of dilutions of only pure culture and of only peptone, but the killing of snails was delayed. This suggests that peptone activates the bacillus in attacking the molluscs, as it had been previously shown (Dias, 1953). A similar experiment was made with water containing grinded snails (that had been killed by culture plus peptone), but again the killing of the snails was slower than in the equivalent dilutions of a mixture of peptone and pure culture.

Incidentally, no effects of cultures were noticed on mosquito larvae in these experiments.

4 — One per cent dilutions of *B. pinottii* in cultures (1) on 5% boiled blood, (2) 5% fresh blood and (3) in water from snails that were killed by culture and peptone, were tried on snails in similar glasses, one with just water serving as control. While in this one the molluscs remained alive after 5 days exposure, the other results were as follows:

Mortality of snails, per centage

Days	*Boiled blood*	*Fresh blood*	*Water from snails*
1	10	0	20
2	20	20	40
3	50	40	40
4	80	70	90
5	100	90	100

5 — Pool at the Snail Destruction Section.

This artificial cement pool, 900 litres capacity, was divided in two communicating parts (fig. 1). Part 1, with about 500 litres water, was

Fig. 5 — Culture spraying (experiment 7); fig. 6 — transportation of culture in drums for experiment 8; fig. 7 — spreading cultures (experiment 8).

treated on September 17 with 3,700 cc of a thick fluid prepared some weeks earlier by dissolving peptone into *B. pinottii* culture. 48 hours

later a good growth was apparent in both parts of the pool. The characteristic odour, which was intense, subsided on the 3rd day and disappeared on the 4th day, when some dead and apparently diseased snails were seen; fish were alive and remained so during all the experiment's duration. In the first days after the treatment the water's volume increased and some water passed to a nearby pool (3, fig. 1). It was noticed that the number of dead snails increased with time in parts 1 and 2 of the pool. On September 29 dead *Planorbis* and *Lanistes* were again seen there, and dead *Bulinus* and *Ampullaria* were seen in 3 (one dead *Ampullaria* was then taken from there and put in an aquarium containing several living *Lanistes* and other snails, which died in some 12 days). On September 30 (13 days), microscopic examination of the water from parts 1 and 2 (which had turned green) showed a large number of green protozoa. On October 5 (18 days) 86 dead (51,2%) *P. boissyi* were counted in part 1. Although the experiment was intended to show the propagation of the bacilli and their effect upon snails, a count was made on the 23rd day but the molluscs from (1), (2) and (3) were mixed up before counting; the following numbers and percentages of dead snails were obtained on October 10: *Planorbis* 178 (22,5%), *Melania* 37 (68,5%), *Vivipara* 22 (30,1%), *Lanistes* 18 (24,6%), *Bulinus* 16 (64,0%), *Physa* 12 (37,5%), *Cleopatra* 8 (88,8%) and only one living *Lymnaea* was found on that day.

30 days after the treatment the following result was obtained in snails collected from (1):

Snail	*Total no.*	*Dead*	% *Dead*
Planorbis	1 005	837	83,3
Physa	137	135	98,5
Vivipara	101	89	88,1
Bulinus	67	53	79,1
Lanistes	78	45	57,7
Cleopatra	20	20	100,0
Lymnaea	14	14	100,0
Ampullaria	12	0	0,0

Planorbis collected from the three parts on the 30th day showed a global mortality of 77,5% and on the 40th day, the last available result, a global mortality of 82,5%.

6 — Pools at the Research Institute

High concentrations of cultures were used in these experiments, in order to show that quick results could be obtained, so that the procedures could eventually be tried in the field under similar conditions. Trials were carried out in cement pools (fig. 2) with a thin layer of water and numerous molluscs. The following *B. pinottii* cultures were used: (1) in 1% peptone, (2) in 2% peptone and (3) in 10% boiled blood. One

similar pool was kept as control. Unfortunately these experiments were partly spoiled because not all the pools contained all the molluscan species that were used.

Results after 5 days exposure were as follows:

SPECIES	1% PEPTONE		2% PEPTONE		10% BLOOD		CONTROL	
	Nr. exam.	% dead	Nr. exam.	% dead	Nr. exam.	% dead	Nr. exam.	% dead
Cleopatra	240	62,5	973	98,7	235	76,6	149	14,1
Physa	150	66,6	175	100	42	95,2	=	=
Vivipara	120	75,0	287	99,7	69	95,7	44	0
Planorbis	55	90,9	=	=	=	=	=	=
Bulinus	48	83,3	5	100	=	=	=	=
Lymnaea	45	88,9	7	100	1	100	9	0
Lanistes	35	28,6	36	100	66	54,5	44	0
Melania	30	83,5	56	89,3	15	66,6	30	13,3
	723	69.8	1 539	98,7	428	77,8	276	8,7

b) Experiments in the field

7 — A part of a drain near the Pyramids (figs. 3, 4, 5), nearly 40 m long, 1,5 wide and 0,5 m deep was separated from the rest of the drain by a mud wall. After most of the water had been removed, it was heavily sprayed with *B. pinottii* cultures to which 5 per cent powdered peptone was added (November 3, 1953). Vegetation was only grass and there were many snails from different species. Next day the water volume had increased and dead snails as well as small dead fish could be seen there. On November 5 the drain section was full of water and was starting running over the mud wall; a number of snails was then collected, washed in fresh water in the laboratory and counted next day, with following results:

Species	*No. collected*	*No. dead*	*Per cent mortality*
Vivipara	338	338	100
Lymnaea	111	111	100
Physa	104	99	95
Melania	34	34	100
Bulinus	36	36	100
Lanistes	32	32	100
Cleopatra	11	10	90
	666	660	99

Two other small sections of the same drain were similarly treated, one with culture in 20% boiled blood and the other with water from a drum that contained a large number of dead snails; although some dead snails were found 48 hours later, results proved to be far interior to the above ones.

Fig. 8 — Examining of a drain section 24 hours after treatment (experiment 8); fig. 9 — spraying a small drain with *B. pinottii* culture and peptone.

8 — In a similar partition of another drain (near Imbaba) a preliminary experiment had been performed, with large amounts of blood and peptone cultures, but without the water volume being reduced (nearly 30 cubic meters); since during some weeks only a small snail

mortality was noticed, another treatment was performed there (figs. 6, 7), with nearly 150 liters of peptone culture plus 5% powdered peptone, after most of the water had been taken off (November 25, 1953). Next

Fig. 10 — Spraying a small drain with *B. pinottii* culture and peptone; fig. 11 — workers from the Snail destruction Section with nets.

day, however, the water had come back (fig. 8) and it looked as if a good growth occurred *in loco*, in spite of the temperature being low; dead snails were seen.

Results after one week were as follows:

Snail	*Total*	*Dead*	*%*
Physa	150	148	98,7
Planorbis	35	34	97,1
Lymnaea	4	4	100

9 — A small drain containing a small amount of water, grass and many *Physa* was closed from the distal end and sprayed with 24 liters culture plus 10% peptone (figs. 9, 10). *Planorbis* did not exist there, but some specimens were introduced there from a nearby canal. Next morning snails were collected and examined after being washed in fresh water for two days: 52 out of 94 *Physa* (55,3%) and 20 out of 22 *Planorbis* (90,0%) were dead. After the only counting of dead and living snails from this drain, the experiment was spoiled by the owner of the drain, who opened and cleaned it next day.

10 — (Luxor, Nov. 21, 1953) — A small collection of water, containing many *Bulinus,* was separated from the main body by a mud wall and divided into two parts. To one of them, 2 liters of a thick paste (prepared on August 8) made of peptone and BET culture. Ten days later 36% of the snails from the treated part were found to be dead and 13 days after the treatment the mortality was 79%, while in the control part there were no dead *Bulinus*. On this day fresh snails of same species were added to the previously treated water and 70,6% of these were dead a week later.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Although research work on the biological snail control has just started, from the results described in the present paper and in others it may be seen that this line of investigation seems to be a very promising one. As it is rightly stated by McMullen (1952), "Observations in the laboratory and the field by various individuals have indicated that snail colonies sometimes disappear but reasons for this are not understood. The effect of bacteria, fungi and viruses on snails and their environment has received little attention and it is possible that something of value would be discovered in such investigations". During his observations upon the rearing of *A. glabratus* in the laboratory, Standen (1951) incidentally noticed that "Inclusion of meat extracts, 'Marmite' or other similar substances, is not advisable, because they diffuse out into the aquaria and soon set up undesirable bacterial activity", and Cowper (1946) has found that in certain localities "tre tap-water contains a fungus (*Catenaria*) which attacks and destroys mollusc (*P. guadeloupensis*) egg-nests".

Bacillus pinottii was apparently the first useful microbe to be isolated from snails, in Brazil. It appears to be a saprophytic bacterium that under certain conditions may develop some degree of virulence.

Morphologically similar bacilli from snails have been encountered in Venezuela (personal communication from J. F. Torrealba) and now in Egypt.

The search for other useful microbes is being carried out and should be encouraged everywhere, and opportunities should not be missed for trying to isolate pathogenic organisms from snails, that could possibly be responsible for naturally occurring epizootics (which, by the way, the writers never happened to observe).

It is important to look not only for new, useful microbes but also for cheap peptones or other cheap nutrient substances that might be used as culture media. Quite recently, Dias (1954 b) has published a paper in which are described new biochemical procedures for snail control, based on the effect of mollasses and other materials on the snail's environment, with or without the addition of special microorganisms (yeasts, bacteria). He also succeeded in quickly eradicating molluscan colonies by introducing into the water spontaneously fermented mollasses plus pure mollasses or pure mollasses alone (unpublished data).

In the present paper it has again been shown that *B. pinottii* is harmless to vertebrates (guinea pig, dog, chick, gerbil) and that it is also probably harmless to man. As to its effects on Egyptian snails, it has been shown that under certain conditions it is lethal for *Bulinus*, *Planorbis* and other molluscs. Field experiments have clearly demonstrated the quick lethal effect of cultures plus peptone in drains containing comparatively small amounts of water, although these amounts have increased soon after the experiments have started. Substitution of peptone cultures by blood cultures did not prove to be as effective in the field. Since peptone is rather expensive in Egypt, this method of control, as it has been used in the field trials here described, probably could not be extensively adopted there. On the other hand, we feel sure (from the results already obtained in Brazil and from what is known about the conditions of breeding places in Egypt) that similar good results may be easily obtained by means of one of the much less expensive biochemical methods recently developed, especially the ones in which mollasses are used.

Biological control measures are probably easier to be taken in Egypt against *P. boissyi* than against *B. truncatus*. In fact, according to Helmy (1953), *P. boissyi* has a limited, irregular distribution in the Nile Valley; its chance of life is only offered if the snail finds its way into stagnant water, which is the only place in which it can settle and breed. The Nile River is apparently free from the snail, so destruction of a colony means irreparable extinction of a focus. It is thus clear that the essential characters of a *P. boissyi* focus in Egypt are that the water should be (a) sufficiently stagnant and (b) sufficiently permanent".

As to *Bulinus*, it is known that it occurs both in Lower and in Upper Egypt and that it is common in the source basin of the Nile. "Surveys of the banks of the Nile showed the snails in some back-water baylets containing vegetation. From March to July, when the water level of

the river is at its lowest, residual pools are found on either side of the bed. These are full of aquatic weeds and serve as favorable breeding places for *Bulinus* and in many instances have been responsible for local bilharzia infection". (Abdel Azim, 1948). "As to the bays which lie along the banks of the river... in Egypt they do not become suitable for *Bulinus* breeding before April, that is to say six to seven months after the end of the flood" (Helmy, 1953).

Biological treatments of breeding places (preferably with mollasses) should apparently be best carried out during occasions when the water is at its lowest, and it is known that desiccation of the irrigation channels is easy to obtain; for this, profit should be taken from the usual irrigation operations: "In Egypt water is under control in that irrigation channels are constantly submitted to such operations as I) The winter stoppage, when the water is shut off in the agricultural districts for the period of forty days... II) The summer rotations, when the canals are given a full supply every alternate week only, so as to avoid water--logging of the lands during the Nile flood. This repeated desiccation inflicts serious losses on the snail fauna, even to its entire destruction... (Helmy, 1953).

Since "The Egyptian species, *Bulinus truncatus* and *Planorbis boissyi* are nonoperculate and entirely aquatic. Their successful destruction would cut the bilharziasis problem at its root and it is the method of choice for the control of the disease" and since "From 1942 onwards, the Bilharzia Snail Destruction Section has been making complete snail surveys... The surveys are still going on and will ultimately cover the whole country, giving a complete picture of the distribution and intensity of infestation with these snails" (Abdel Azim), conditions for trying and using new effective weapons for controlling these pests appear to be especially favorable in this country. As Dr. Abdel Azim put it, "The prospects for effective control in Egypt are favorable, for, unlike other countries with a bilharzia problem, the area infested with snails is sharply defined. The water supply is under the control of the Irrigation Department, which makes possible a large measure of control over the breeding places".

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Embora tenham apenas começado as pesquisas sôbre as possibilidades do contrôle biológico dos caramujos, pode ver-se, pelos resultados descritos neste e em outros trabalhos, que esta linha de investigação parece de fato ser muito promissora. Como bem disse McMullen (1952), "Observations in the laboratory and the field by various individuals have indicated that snail colonies sometimes disappear but reasons for this are not understood. The effect of bacteria, fungi and viruses on snails

and their environment has received little attention and it is possible that something of value would be discovered in such investigation".

No decurso de suas observações sôbre a criação de *A. glabratus* no laboratório, notou incidentemente STANDEN (1951) que "Inclusion of meat extracts, 'Marmite' or other similar substances, is not advisable, because they diffuse out into the aquaria and soon set up undesirable bacterial activity". E COWPER (1946) observou que em certas localidades "the tap-water contains a fungus (*Catenaria*) which attacks and destroys mollusc (*P. guadeloupensis*) egg-nests".

O *Bacillus pinottii* foi aparentemente o primeiro micróbio útil a ser isolado de caramujos, no Brasil, parecendo ser êle uma bactéria saprófita que em certas circunstâncias pode se tornar virulenta. Bacilos que se lhe assemelham morfològicamente foram encontrados em caramujos na Venezuela (comunicação pessoal de J. F. TORREALBA) e agora no Egito. Deve ser incrementada a pesquisa de outros micróbios úteis por tôda a parte, e não se deve perder oportunidade para tentar isolar microorganismos patogênicos de moluscos, que serão possìvelmente responsáveis por epizootias naturais dêstes animais (que, aliás, nunca foi dado aos presentes autores observar).

É importante procurar, não sòmente novos micróbios úteis, mas também conseguir a obtenção de peptonas baratas ou outras substâncias nutritivas de baixo custo, que possam servir como meio de cultura. Recentemente, DIAS (1954b), publicou um trabalho no qual descreve novos processos bioquímicos para contrôle de caramujos, baseados na ação do melaço e de outros materiais sôbre o meio aquático, com ou sem a adição de microorganismos especiais (levêdos, bactérias): também conseguiu erradicar ràpidamente colônias de moluscos por meio de tratamento em que empregou o melaço fermentado espontaneamente e acrescido de melaço puro, ou de sòmente melaço puro (dados não publicados).

No presente trabalho tornou a ser demonstrado que o *B. pinottii* é inócuo para os vertebrados (cobaia, cão, galinha, "*girbil*") e que também é, provàvelmente, inócuo para o homem. Quanto a ação em relação aos caramujos egípcios, foi demonstrado que em certas condições êle é letal para *Bulinus, Planorbis* e outros moluscos. Experiências de campo mostraram claramente o rápido efeito letal de culturas com peptonas em drenos contendo volume d'água comparativamente pequeno, embora êsse volume aumentasse logo depois de começadas as experiências. A substituição das culturas em peptona por culturas em sangue de boi não se mostrou tão eficaz, no campo. Desde que a peptona importada é um produto caro, no Egito, êste método, tal como foi empregado nas experiências aqui descritas, provàvelmente não poderia ser extensivamente adotado no país. Por outro lado, parece-nos certo (pelos resultados já obtidos no Brasil e pelo que se sabe das condições dos focos do Egito) que resultados semelhantes e igualmente bons podem ser fàcilmente obtidos por meio de um dos processos bioquímicos muito mais baratos recentemente criados, especialmente aqueles em que o melaço é empregado.

the river is at its lowest, residual pools are found on either side of the bed. These are full of aquatic weeds and serve as favorable breeding places for *Bulinus* and in many instances have been responsible for local bilharzia infection". (Abdel Azim, 1948). "As to the bays which lie along the banks of the river... in Egypt they do not become suitable for *Bulinus* breeding before April, that is to say six to seven months after the end of the flood" (Helmy, 1953).

Biological treatments of breeding places (preferably with mollasses) should apparently be best carried out during occasions when the water is at its lowest, and it is known that desiccation of the irrigation channels is easy to obtain; for this, profit should be taken from the usual irrigation operations: "In Egypt water is under control in that irrigation channels are constantly submitted to such operations as I) The winter stoppage, when the water is shut off in the agricultural districts for the period of forty days... II) The summer rotations, when the canals are given a full supply every alternate week only, so as to avoid water--logging of the lands during the Nile flood. This repeated desiccation inflicts serious losses on the snail fauna, even to its entire destruction... (Helmy, 1953).

Since "The Egyptian species, *Bulinus truncatus* and *Planorbis boissyi* are nonoperculate and entirely aquatic. Their successful destruction would cut the bilharziasis problem at its root and it is the method of choice for the control of the disease" and since "From 1942 onwards, the Bilharzia Snail Destruction Section has been making complete snail surveys... The surveys are still going on and will ultimately cover the whole country, giving a complete picture of the distribution and intensity of infestation with these snails" (Abdel Azim), conditions for trying and using new effective weapons for controlling these pests appear to be especially favorable in this country. As Dr. Abdel Azim put it, "The prospects for effective control in Egypt are favorable, for, unlike other countries with a bilharzia problem, the area infested with snails is sharply defined. The water supply is under the control of the Irrigation Department, which makes possible a large measure of control over the breeding places".

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Embora tenham apenas começado as pesquisas sôbre as possibilidades do contrôle biológico dos caramujos, pode ver-se, pelos resultados descritos neste e em outros trabalhos, que esta linha de investigação parece de fato ser muito promissora. Como bem disse McMullen (1952), "Observations in the laboratory and the field by various individuals have indicated that snail colonies sometimes disappear but reasons for this are not understood. The effect of bacteria, fungi and viruses on snails

and their environment has received little attention and it is possible that something of value would be discovered in such investigation".

No decurso de suas observações sôbre a criação de *A. glabratus* no laboratório, notou incidentemente STANDEN (1951) que "Inclusion of meat extracts, 'Marmite' or other similar substances, is not advisable, because they diffuse out into the aquaria and soon set up undesirable bacterial activity". E COWPER (1946) observou que em certas localidades "the tap-water contains a fungus (*Catenaria*) which attacks and destroys mollusc (*P. guadeloupensis*) egg-nests".

O *Bacillus pinottii* foi aparentemente o primeiro micróbio útil a ser isolado de caramujos, no Brasil, parecendo ser êle uma bactéria saprófita que em certas circunstâncias pode se tornar virulenta. Bacilos que se lhe assemelham morfològicamente foram encontrados em caramujos na Venezuela (comunicação pessoal de J. F. TORREALBA) e agora no Egito. Deve ser incrementada a pesquisa de outros micróbios úteis por tôda a parte, e não se deve perder oportunidade para tentar isolar microorganismos patogênicos de moluscos, que serão possìvelmente responsáveis por epizootias naturais dêstes animais (que, aliás, nunca foi dado aos presentes autores observar).

É importante procurar, não sòmente novos micróbios úteis, mas também conseguir a obtenção de peptonas baratas ou outras substâncias nutritivas de baixo custo, que possam servir como meio de cultura. Recentemente, DIAS (1954b), publicou um trabalho no qual descreve novos processos bioquímicos para contrôle de caramujos, baseados na ação do melaço e de outros materiais sôbre o meio aquático, com ou sem a adição de microorganismos especiais (levêdos, bactérias): também conseguiu erradicar ràpidamente colônias de moluscos por meio de tratamento em que empregou o melaço fermentado espontaneamente e acrescido de melaço puro, ou de sòmente melaço puro (dados não publicados).

No presente trabalho tornou a ser demonstrado que o *B. pinottii* é inócuo para os vertebrados (cobaia, cão, galinha, *"girbil"*) e que também é, provàvelmente, inócuo para o homem. Quanto a ação em relação aos caramujos egípcios, foi demonstrado que em certas condições êle é letal para *Bulinus, Planorbis* e outros moluscos. Experiências de campo mostraram claramente o rápido efeito letal de culturas com peptonas em drenos contendo volume d'água comparativamente pequeno, embora êsse volume aumentasse logo depois de começadas as experiências. A substituição das culturas em peptona por culturas em sangue de boi não se mostrou tão eficaz, no campo. Desde que a peptona importada é um produto caro, no Egito, êste método, tal como foi empregado nas experiências aqui descritas, provàvelmente não poderia ser extensivamente adotado no país. Por outro lado, parece-nos certo (pelos resultados já obtidos no Brasil e pelo que se sabe das condições dos focos do Egito) que resultados semelhantes e igualmente bons podem ser fàcilmente obtidos por meio de um dos processos bioquímicos muito mais baratos recentemente criados, especialmente aqueles em que o melaço é empregado.

Provàvelmente as medidas de contrôle biológico serão mais fàcilmente tomadas no Egito em relação ao *P. boissyi* do que ao *B. truncatus*. Com efeito, segundo HELMY (1953), "*P. boissyi* has a limited, irregular distribution in the Nile Valley; its chance of life is only offered if the snail finds its way into stagnant water, which is the only place in which it can settle and breed. The Nile River is apparently free from the snail, so destruction of a colony means irreparable extinction of a focus. It is thus clear that the essential characters of a *P. boissyi* focus in Egypt is that the water should be (a) sufficiently stagnant and (b) sufficiently permanent".

Com relação ao *Bulinus*, sabe-se que êle ocorre tanto no Baixo quanto no Alto Egito e que êle é comum na própria Bacia do Nilo. "Surveys of the banks of the Nile showed the snails in some back-water baylets containing vegetation. From March to July, when the water level of the river is at its lowest, residual pools are found on either side of the bed. These are full of aquatic weeds and serve as favorable breeding places for *Bulinus* and in many instances have been responsible for local bilharzia infection" (ABDEL AZIM, 1948). "As to the bays which lie along the banks of the river... in Egypt they do not become suitable for *Bulinus* breeding before April, that is to say six to seven months after the end of the flood" (HELMY, 1953).

O tratamento biológico dos criadouros (de preferência com melaço) deve aparentemente ser executado de modo mais eficaz nas ocasiões em que a água está reduzida ao mínimo, e é sabido que a dessecação dos canais de irrigação é fácil de se obter; com êste fim, devem aproveitar-se as usuais operações de irrigação: "In Egypt water is under control in that irrigation channels are constantly submitted to such operations as I) The winter stoppage, when the water is shut off in the agricultural districts for the period of forty days... II) The summer rotations, when the canals are given a full supply every alternate week only, so as to avoid water-logging of the lands during the Nile flood. This repeated desiccation inflicts serious losses on the snail fauna, even to its entire destruction... (HELMY, 1953).

Desde que "The Egyptian species, *Bulinus truncatus* and *Planorbis boissyi* are nonoperculate and entirely aquatic. Their sucessful destruction would cut the bilharziasis problem at its root and it is the method of choice for the control of the disease" e que "From 1942 onwards, the Bilharzia Snail Destruction Section has been making complete snail surveys... The surveys are still going on and will ultimately cover the whole country, giving a complete picture of the distribution and intensity of infestation with these snails" (ABDEL AZIM), as condições para experimentar e empregar novas armas para o contrôle dos caramujos parecem ser especialmente favoráveis nesse país. Como disse o dr. ABDEL AZIM "The prospects for effective control in Egypt are favorable, for unlike other countries with a bilharzia problem, the area infested with snails is sharply defined. The water supply is under the control of the Irrigation Department, which makes possible a large measure of control over the breeding places".

REFERENCES

Abdel Azim, M., 1948, Problems in the control of schistosomiasis (bilharziasis) in Egypt. *Proc. IV Int. Congr. Trop. Med. Malaria:* 1013-1021.

Cowper, S. G., 1946, Some notes on the maintenance and breeding of Schistosome vectors in Great Britain, with special reference to *Planorbis guadeloupensis* Sowerby. *Ann. Trop. Med. Parasit.,* 40: 163-170.

Cruz Filho, O. & Dias, E., 1953, *Bacillus pinottii* sp. n. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.,* 46 (6): 581-582.

Dias, E., 1953*a*, *Nova possibilidade de combate aos moluscos transmissores das esquistossomoses,* 22 pp. *Empr. Edit. "O Eco", Bambui.*

Dias, E., 1953*b*, Bacteriological warfare on the intermediate host of human schistosomiasis. *V Congr. Med. Trop. Malaria,* Istambul, agosto-setembro, mimeogr.

Dias, E., 1954*a*, Guerra bacteriológica contra os transmissores intermediários da esquistossomose humana. Bacteriological warfare on the intermediate hosts of human schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*

Dias, E., 1954*b*, Nota prévia sôbre ensaios de combate aos planorbídeos por métodos biológicos e bioquímicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 52 (1): 247-252.

Helmy, M., 1953, The effect of environmental factors on the distribution and control of *Planorbis boissyi,* the intermediate host of *Schistosoma mansoni* in the valley of the Nile. *J. Trop. Med. Hyg.,* pp. 25-32.

Hook, A.E. & Fabian, F.W., 1943, Chemical and bacteriological studies on peptone. *Michigan State Coll. Agric. Exper. Stat., Technical Bull.,* 185: 34 pp.

McMullen, D.B., 1952, Molluscacides and other means of snails destruction. World Health Organization, Expert Committee on Bilharzia, WHO, 11-august-1951, Bol. mimeogr.

Standen, O.D., 1951, Some observations upon the maintenance of *Australorbis glabratus* in the laboratory. *Ann. Trop. Med. Parasit.,* 45: 80-83.

2) Makulo-papulöse Eruptionen, gruppiert oder einzeln ohne Ordnung und Lokalisation, rötlich-gelb gefärbt, manchmal mit vesikulösem Zentrum, an Insektenstische erinnernd;
3) Ein erysipeloides Exanthem, in der Form ausgebreiteter Flecke, gewöhnlich an den Extremitaeten sitzend, schmerzend, auf Druck weich, von allgemeinen Symptomen begleitet, hauptsächlich Fieber;
4) Multiple erysipelähnliche Flecken, neben subkutanen, cyanotischen, glanzlosen Knoten, analog dem *Erythema nodosum;*
5) Ein ausgebreitetes erythematisches *rash,* weite Teile des körpers bedeckend, einschliesslich die Schleimhäute, mit allgemeinen Symptomen (hohes Fieber, Prostration), an Scharlach erinnernd;
6) Schuppende, braunrote, juckende Läsionen an Armen und Handgelenken, ähnlich *Psoriasis;*
7) Kleine ulceröse oder ulcerokrustöse Läsionen, an den Extremitäten, ähnlich *Ekthyma;*
8) Hellrote, scheibenförmige, schuppende Flecke, an *Ptiriasis rosea* erinnernd;
9) Kontaktdermatitis, fleckenförmig, makulo-papulös oder pustulös;
10) Ulceröse Dermatitis;
11) Eksematöse Läsionen.

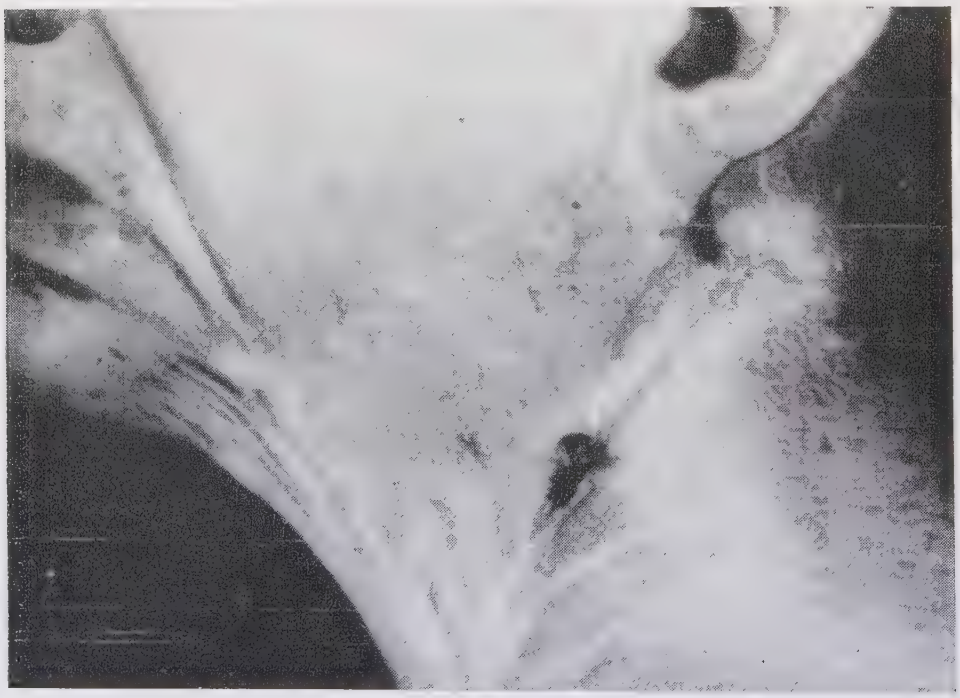


Fig. 2 — Skrofuloese Laesionen, subkutane ulzerierte Knoetchen, die nach der Regression wieder erschienen.

Die Aufstellung zeigt die beträchtliche Verschiedenheit der Hauterscheinungen.

Ibarra (3) zählt bei den von ihm beobachteten Brucellosen auf: Exantheme, Enantheme, Aphten, Haarausfall, Papeln, indem es ihm gelang, bei einigen dieser Läsionen Brucellen zu isolieren.

Fig. 3 — Kongestive Infiltration mit sekundaerer Pigmentation und konsistentem Oedem.

Die zuerst beschriebenen Dermatobrucellosen traten bei Tierärzten auf nach Berührung der Haut mit infiziertem Material, insbesondere Plazenta und Plazentaflüssigkeit von abortierten, brucellosekranken Tieren. Die Hauterscheinungen — unter der Form eines ausgebreiteten erythematösen oder makulopapulösen und knötchenartigen Ausschlages — erschienen wenige Stunden nach dem Kontakt oder in den ersten

Tagen darauf. Im allgemeinem verschwinden sie in kurzer Zeit, ohne Hinterlassungen von Spuren, und treten nur selten später erneut auf. Sie repräsentieren Reaktionen der Haut auf das Eindringen des Erregers, durch die intakte Haut, also die Eingangspforte des Keimes.

Rimbaud und Mitarbeiter (4), Jordan & Borts (5) beobachten ein masernfoermiges Exanthem.

Pons & Valenti (6) sahen das Auftreten von Purpura, z. T. ausgedehnt, und in Peziehung zu Gefaess-und Blutlaesionen.

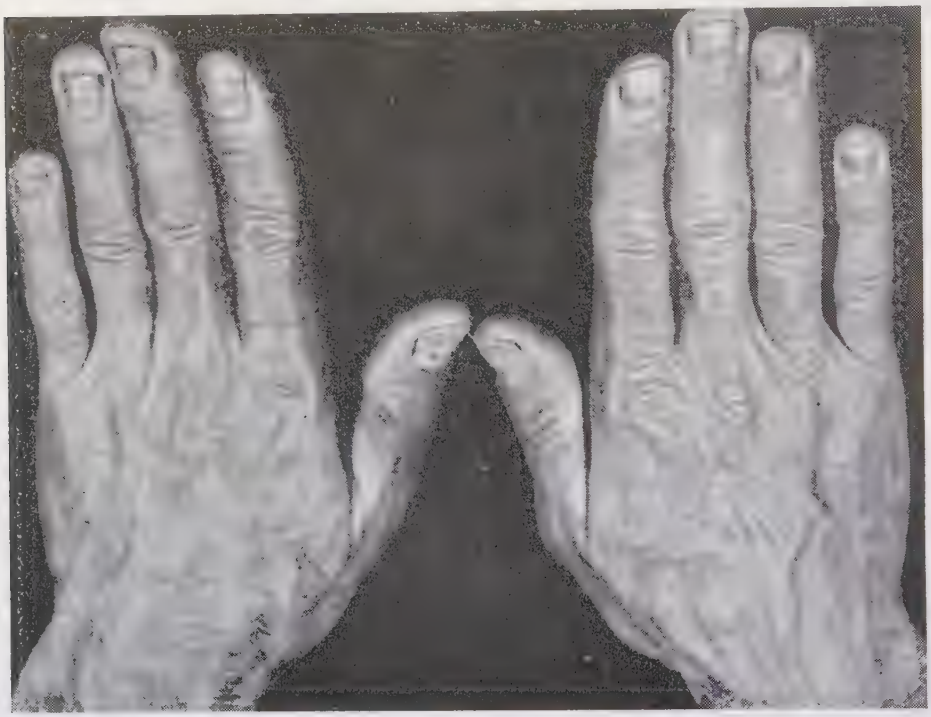


Fig. 4 — Trockenes Oedem der Haende mit distrophischen Laesionen der Naegel.

Avery (7) beobachtete das Auftreten von Ekchymosen und Petechien, abgesehen von hellroten Flecken und Roetung an der Fussohle von scharlachaehnlichen, masernaehnlichen oder makulo-papuloesem Charakter. Ferner wurde ein *Erythema exsudativum multiforme* von Mueller beschrieben, waehrend Laesionen vom Typ des *Erythema nodosum* mit tuberkuloidem Bau von Kleinmann & Yampolsky nach Signorelli (8), beschrieben wurden.

Tovar Mancera (9) beschreibt eine geschwuerartige laesion des Gesichtes mit Bildung einer dunklen, trockenen Kruste mit blutigse-

roeser Sekretion an den Raendern. Wir selbst fanden einen Patienten mit analoger Laesion, dem ulceroese *Adenitis* voranging, die wir als "brucelloeses Skrophuloderm" bezeichnen (10).

Fig. 5 — Ekzemato-krustoese Laesionen der Beine und Haende.

Mancera beschreibt ausserdem Laesionen noduloesen Typs, leicht cyanotisch, von starkem Oedem umgeben, durch Druck schmerzhaft, am Gesicht, Unterschenkel und juxta-artikulaersitzend, die lange Zeit hindurch als derbe Knoten bestehen bleiben, und dunkelrote, verstreute oder lokalisierte Laesionen waren. Photographie 2 ist eine Laesion diesen Typs.

Hautveraenderungen wurden beobachtet und mitgeteilt von Mazza & Mitarbeitern (12), Piulachs & Vidal (13), Morones (15), Ibarra (3), Michel-Bechet (14), Haxthausen & Thomsen (16).

Ekzemathoese, ekzematho-krustoese oder erysipelartige Hautveraenderungen kommen ziehmlich haeufig vor. Bild 4 stellt einen Gutsreiter

dar, der durch trockenes Handekzem das ihm das Arbeiten verhinderte und dass in kurzer Zeit durch die spezifische Behandlung geheilt wurde.

Fig. 6 — Vesikulo-krustoese verbreitete Laesionen — Pemphigo-Brucellose.

Bild 5 stellt einen Patienten dar, der taeglich auf einem Pferde ritt, und welcher eine beiderseitige Kontaktdermatites an den Unterschenkel aufweist. Die Laesion verwandelte sich in ein trockenes Ekzem, breitete sich auf die Haende aus, und hielt sich viele Monate. Begann als ein juckendes Erythem, dann traten Kratzflecke auf, schliesslich bildete sich ein trockenes schuppendes Ekzem.

Desmontes beschrieb eine erythemato-krustoese Form der Eruption an Gesicht und Extremitaeten mit konsekutiver Pigmentation.

Eine schwere Form stellt die von uns als "brucelloese Pemphigus" beschriebene Form dar. Es erscheinen Blasen oder Blaeschen an der Haut des ganzen Koerpers, mit starkem Juckreiz, die sich in Krusten

verwandeln, gelegentlich mit Allgemeinerscheinungen, wenn es zur Sekundaerinfektion kommt.

Bei schwerem Verlauf leidet der Allgemeinzustand, besonders wenn der Blaescheninhalt sich eitrig truebt, infolge der Infektion durch die Erreger an der Haut. Bei dem Patienten auf Fig. 7 sieht man den ganzen Koerper mit Blaeschen, Papulen und eingetrockneten Krusten bedeckt und auch Fingerlaesionen.

Fig. 7 — Blaeschen, Papulen und eingetrokenen Krusten.

Der Patient wird unmutig und schlaflos, die Hautveraenderungen bleiben monatelang unveraendert bestehen, oder bilden sich zurueck, Blaeschen oder kleine Krusten hinterlassend. Die differenzige Diagnose gegenueber Pemphigus wird von den Dermatologen noch umstritten, jedoch erlaubt die histologische Untersuchung der Blaeschen diese blasenfoermige Eruption als brucellose Pemphigus anzusehen.

Bei mehreren Patienten mit diskreten dunkelroten Hauterscheinungen mit sogenannten "Flecken der Traurigkeit oder der Melancholie" erhielten wir positive Reaktionen auf Bruzellose und Verschwinden dieser Hautveraenderungen durch spezifische Therapie.

Relativ haeufige Veraenderungen finden sich an den Anhangsgebilden der Haut: trockene Naegel, zerbrechliche, fleckig Naegel mit ver-

tieften Streifen; Haarausfall, glanzloses, hartes, trockenes Kopfhaar; Naegelveraenderung, Perionix wie bei Fig. 8 zu sehen.

Figs. 8-9 — Distrophische Laesionen der Naegel und Peritonix.

Die Hauterscheinungen treten zu Beginn oder im Verlauf der Infektion auf, aber mit gewisser Haeufigkeit erscheinen sie kurz vor oder gleichzeitig mit dem symptomatischen Krisen der Brucellose: Fieberattaken, pneumonische Infiltrate, Darmstoerung, Nevralgien oder anderen der vielfachen Symptome dieser merkwuerdigen Krankheit, dabei koennen sie isoliert fuer sich oder kombiniert auftreten. Aus diesem Grunde koennen die Dermatobrucellosen zu den symptomatischen Krisen gerechnet werden. Es gehoeren dazu auch die Nasenblutungen, Haemoptiesen, beide Folgerscheinungen von Gefaessveraenderungen an der Haut und andere Veraenderungen, wie sie bei Brucellosen bekannt sind.

Gleichfalls derselben Natur sind die Hautaffektionen, insbesondere die masernfoermigen Eruptionen, die mehrere Male waehrend der Behandlung mit spezifischer Vakzinentherapie oder bei Anwaendung der Brucellosen Allergene, bei der diagnostischen Kutanprobe, beobachtet worden sind.

Von Wichtigkeit fuer die Erkennung der Dermatobrucellosen ist das lange Bestehenbleiben der Laesionen, bei der Mehrzahl der Kranken ueber Monate und Jahren, und die schlechte therapeutische Anssprechbarkeit auf die verschiedenen aerztlichen lokalen Behandlungsmethoden.

LITERATUR

1. Harris, H. J., 1950, *Brucellosis (Undulant Fever). Clinical and subclinical,* 2nd ed., New York (cf. pp. 138-143; 255-266).

2. Simpson, W.M., 1930-1931, Undulant Fever (Brucelliasis). A Clinicopathologic Study of Ninety Cases Ocurring in and about Dayton, Ohio. *Ann. Int. Med.,* 4(3):238-259.

3. Ibarra, G.G., 1948, Estudio clinico general de enfermos brucelosos, *1.ª Reunión Interamer. Bruc.* (México, 1946):485-491.

4. Raimbaud, L., Janbon, M. & Alquié, R., 1937, Érythème morbilliforme généralisé au cours d'une melitococcie. *Arch. Soc. Sci. Méd. Biol. Montpellier,* 18(11):647-648.

5. Jordan, C.F. & Borts, I.H., 1946, Occurrence of *Brucella melitensis* in Iowa. *J. Amer. Med. Ass.,* 130(2):72-75.

6. Pedro-Pons, A. & Valentí, P.F., 1944, *La brucelosis humana (Fiebre de Malta—Enfermedad de Bang), Barcelona* (cf. pp. 220-222).

7. Avery, H., 1942. The Clinical aspect of Undulant Fever. *J. Trop. Med. Hyg.,* 45(19):145-153.

8. Signorelli, S., 1949, *L'Infezione Brucellare nell'Uomo,* 2.ª ed., Napoli.

9. Tovar-Mancera, R., 1940, *Rev. Med. Hosp. General,* 2:600.

10. Pacheco, G., 1950, Escrófula brucelosa. Considerações em tôrno de um caso. *Rev. Bras. Med.,* 7(10):651-655.

11. Pacheco, G., 1954, Pênfigo bruceloso. *Rev. Bras. Med.,* 11(7):466-469.

12. Mazza, S., Cornejos, A. & Caro, A., 1936, Ulceraciones y necrosis en la fiebre ondulante. *8.ª Reunión Soc. Arg. Patol. Reg. del Norte* (1933): 734-736.

13. Piulachs, P. & Vidal-Barraquer, F. 1951, Las lesiones cutaneas en la brucelosis (Un nuevo tipo etiologico de úlcera de las extremidades inferiores). *Rev. Clin. Española,* 12,42(6):388-393.

14. Michel-Bechet, R., 1939, *Localizations viscérales et aspects chirurgicales des brucelloses,* Paris.

15. Morones, S., 1948, Algunos aspectos clínicos de la brucelosis. *1.ª Reunión Interamer. Bruc.* (México, 1946):563-568.

16. Haxthausen, H. & Thomsen, A., 1931, Brucella-Ausschlag bei Tierärzten (Eine eigentümliche, professionelle Hautaffektion, wahrscheinlich allergischer Natur, hervorgerufen von Bac. abortus Bang). *Arch. Derm. Syph.,* 163(3):483-491.

Contribution to the normal fecal flora of the hamster.

Proteus mirabilis in normal feces of hamster

Genesio Pacheco and **Vinicius Moreira Dias**
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D.F.

It is important to know the bacterial components of the normal intestinal flora of laboratory animals. In early investigations one of us (Pacheco) found in the vaginal exsudate of a female hamster, in oestrus, microorganisms with characteristics of *Proteus sp*. So we decided to examine the prevalence of *Proteus* in feces of normal hamsters.

METHOD

Samples of fecal material of hamsters (*Cricetus auratus*) were suspended in saline and spread on plates of Teague and Kristensen media. All cultures produced colonies of small, Gram negative, motile rods, spreading on agar surface. Growth in Koser media, liquefation of gelatine, absence of indol production, decomposition of urea in Christensen media and production of hydrogen sulfide in bismuth agar, were the principal characteristics. Acid and gas in dextrose, slow acid in sucrose, no acid in lactose, manitol and maltose. Not pathogenic for mice when given by mouth or by intraperitoneal route. The microorganisms were recovered from feces of all mice inoculated by mouth. The bacteria was identified as *Proteus mirabilis*, apud Bergey's Manual. The presence of *Proteus mirabilis* was sometimes found in feces of not inoculated mice.

Intraperitoneal inoculation in guinea-pigs produced infection with death in the first 36 hours; when inoculated by subcutaneous route the death occurred within 96 hours. In this case there were necrosis in the site of inoculation, and enlargement of ganglia. The microorganisms were recovered from the organs and blood.

DISCUSSION

Varela identified bacterial strains from feces of hamsters with infectious enteritis as *Pr. morgani*. This bacteria reproduced the disease in mice. In his work Varela did not exclude the presence of *Proteus* in healthy animals.

SUMMARY

Proteus mirabilis must be considered a normal inhabitant of the intestine of hamsters. It is also found in the vaginal secretion of females of this animal, when in oestrus.

RESUMO

1) Os hamsters são parasitados pelos *Proteus*.
2) As amostras isoladas foram identificadas ao *Pr. mirabilis* de Hauser.
3) O *Proteus* isolado não revelou ação patogênica sôbre camundongos mas se mostrou patogênico para cobaias.
4) O germen era presente na secreção vaginal de hamsters, na época do cío.

BIBLIOGRAFIA

BERGEY and col., 1948, *Manual of Determinative Bacteriology*, 6th ed.
VARELLA, G., 1953, *Medicina*, 33:479.

A simple micro-incinerator

Milton Thiago de Mello
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D.F.

(With one text-figure)

The increasing use of mineral oil for the preservation of cultures of bacteria and fungi (Arêa-Leão & Cury, 1950; Hartsell, 1953) gave origin to a serious problem during the sterilization of the loops utilized for the transfer of such cultures. In fact, the mixture of mineral oil with the aqueous components of the media and the microorganisms, splatters suddenly when the loop is introduced into the open flame of a gas burner. The aerosols thus formed are heavier than those formed during the flaming of loops carrying only small quantities of common microorganisms (Anderson *et al.*, 1950-1952).

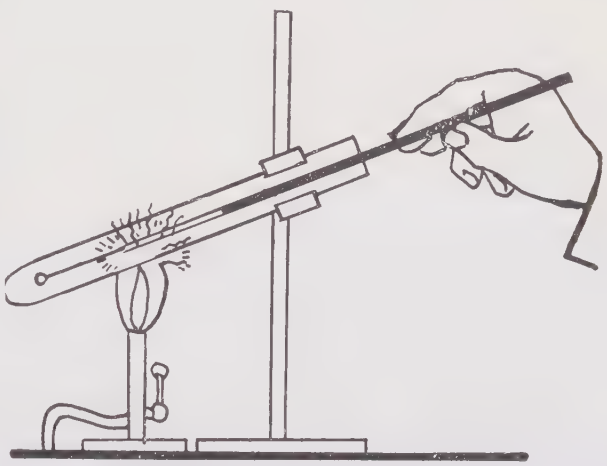


Fig. 1 — Operation with the micro-incinerator.

Due to the presence of fatty substances in *Mycobacteria*, the flaming of loops used with these microorganisms is also very dangerous, a fact which has always been recognized.

To avoid the formation of aerosols during the transfer of cultures preserved under mineral oil (usually in stabs in semi-solid media) Pasteur pippettes are generally employed, and discarded with disinfectant after use. This procedure, of course, is time-consuming and expensive when many cultures have to be transferred daily as is the case in large culture collections. Moreover it is not useful when the cultures are maintained in solid media.

The use of some sort of glass protectors for the burners, chiefly when working with *Mycobacteria*, does not prevent the dissemination of aerosols. Some recent modifications, however, the so-called micro-

-incinerators, are safer, but they are not easily available in most laboratories.

In routine work with pathogenic microorganisms preserved under mineral oil, especially in the constant handling of *Brucella* and *Mycobacterium* species, we use a very simple micro-incinerator that can be mounted in any laboratory.

The device needs only a 18 or 20 mm x 200 mm test tube of fire-resistant glass (for instance Vycor or Pyrex). It is fixed at an angle of about 45°C in a metallic support in front of the operator, in such a manner that a loop can be easily introduced into it.

During the operation the flame of a Bunsen burner is maintained under the middle part of the tube, without reaching any of its two extremities. With an ordinary Pyrex test tube 18 x 150 mm, when an open flame of 1250° C reaches its external wall, the inside temperature is about 800°C, as measured with thermo-couple. When a 30 x 200 mm test tube is used with the same flame, the temperature inside the tube is about 710°C. In both cases a bit of cotton wool introduced slowly into the tube burns explosively when it reaches the super-heated zone.

The loop with the material, the splattering of which must be avoided, is introduced rapidly into the tube (taking care so as to not touch the wall of the tube) until it reaches the botton. The portion of the loop with the microorganisms is then in the least heated zone of the tube, where the material is gradually dissecated (fig. 1). The minimum amounts of aerosols that may be accidentally formed are immediately burned when they pass through the super-heated atmosphere of the middle part of the tube.

After the apparent dissecation, the loop is slowly pulled out of the tube and maintained in the super-heated zone for some seconds and the wall of the tube may now be touched.

The final sterilization of the handle of the loop is made outside the tube.

REFERENCES

Anderson, R.A., Moss, M.L. & Gross, N.H., 1952, Potential infectious hazards of common bacteriological techniques. *Bact. Proc.*, Soc. Amer. Bact., 5th Gen. Meet., 58.

Anderson, R.A., Stein, L., Moss, M.L. & Gross, N.H., 1952, Potential infectious hazards of common bacteriological techniques. *J. Bact.*, 64(4):473-481.

Arêa-Leão, A.E. & Cury, A., 1950, Preservation of pathogenic fungous cultures under mineral oil. 5th International Congress for Microbiology, Rio de Janeiro. (In press).

Hartsell, S.E., 1953, The preservation of bacterial cultures under paraffin oil. *Appl. Microb.*, 1:36-41.

The use of triphenyltetrazolium chloride in the study of dehydrogenase activity of *Brucellae*[*]

Milton Thiago de Mello and **Niber Paz M. Silva**
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D.F.

(With 5 text-figures)

The metabolism of *Brucellae* has been investigated in some instances but a general agreement on many aspects of the problem has not yet been reached. In relation to enzymatic activity in presence of single added substrates, for instance, the data are scarce and somewhat discrepant as was pointed out in HOYER's review (1950).

Since the publication of the papers of KUHN *et al.* (1941) and KUN *et al.* (1949), tetrazolium salts have had their use generalized as indicators of dehydrogenase activity in many enzymatic systems. The use of these oxidation-reduction indicators in bacteriology is very ample in the present moment. Some papers have been published concerning the use of those salts in work with *Brucellae,* for the preparation of ring test antigens (BENDTSEN, 1949, 1950; MOULIN, 1951; WOOD, 1950) or serum agglutination antigens (MELLO, 1951), and for the differentiation of species and variation within them (HUDDLESON *et al.*, 1950).

Most of the enzymatic activities in cells seem to be located in mitochondria (for a review see GREEN, 1951; MUDD *et al.*, 1951c) and these structures are indicated by the reduction of tetrazolium salts to its insoluble colored formazan inside them (GODDARD *et al.*, 1952; NORDMANN *et al.*, 1951; SHELTON *et al.*, 1952; WINTERSCHEID *et al.*, 1952). In bacteria and other microorganisms much evidence is being accumulated that they have mitochondria (MUDD *et al.*, 1951 a, b, c, d; 1952 WINKLER, 1950; WINTERSCHEID *et al.*, 1952). Recent investigations have evidenced sites of intense reduction of tetrazolium salts as intracellular inclusions in many bacteria and fungi (ANTOPOL *et al.*, 1948; BIELIG *et al.*, 1949; CANIZARES *et al.*, 1951; FRED *et al.*, 1949; LEDERBERG, 1948; MUDD *et al.*, 1951 a, c, d; NARAHARA *et al.*, 1950; WINKLER, 1950, WINTERSCHEID *et al.*, 1952).

* This investigation was supported in part by a research grant from Dr. Guilherme Guinle to the senior author. Presented at the Annual Meeting of "Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência", Pôrto Alegre, November, 1952.

The present paper is part of a work planned for the study of dehydrogenase activity of *Brucellae* using tetrazolium salts as hydrogen ions acceptors.

MATERIALS AND METHODS

Cultures — *Brucella abortus* strain 1868 (aerobic strain B-99, from Dr. A. W. Stableforth, Weybridge, England) and *Br. suis* strain 1598 (strain SIG carried on agar, from Dr. S. S. Elberg, University of California, U.S.A.), were used throughout. The dye reactions and urease test were typical of the assigned species.

Cell suspensions — The 48-hour growth of cells on veal infusion agar in Roux flasks was removed with 0.9% sodium chloride solution, filtered through cotton and gauze and washed 5 times in the NaCl solution (3000 rpm during 20 minutes each washing); the final sediment was resuspended in the NaCl solution until a turbidity that gave a reading of 100 when diluted 1:20 (Klett-Summerson photoelectric colorimeter, filter green 54, 13 x 100 Kimble matched test tubes. NaCl solution as blank). The final suspension was tested with 0.1% trypaflavine solution: it was kept at — 4 C to + 2 C and used in the same day.

Solutions — *a*) *Buffer*: M/15 phosphate buffer, pH 7.0. *b*) *Saline solution*: sterile 0.9% NaCl solution. *c*) *TTC*: 0.1% solution of 2, 3, 5 — triphenyltetrazolium chloride (Practical grade, Synthetical Labs., Inc.). *d*) *Substrates*: M/50 solutions of the following representatives of groups of compounds known as important in bacterial metabolism: L-arabinose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-lactose, maltose, D-xylose, i-inositol, D-mannitol, D-sorbitol, DL-alanine, L-asparagine, and glycine (Pfanstiehl); glycerol (City Chem., Co.); sodium acetate (Mallinckrodt); D-glutamic acid, and D-arginine (Eastman Kodak). Succinic acid and citric acid were utilized but owing to the low pH of the final systems, the results were not recorded in this paper; further investigations are in course on this subject.

All reagents were considered pure compounds and the solutions made in glass redistilled water. Substrates and TTC solutions were maintained in frozen state and thawed prior to use.

Measurement of dehydrogenase activity — The techniques of Kun *et al.* (1949) and Hanks (1951) were adapted to the experiments. The tests were made in aerobiosis. The reagents were dispensed in 13 x 100 Pyrex or Kimble test tubes kept at — 4 C to + 2 C, in the following order: 0.2 ml of buffer, 0.1 ml of TTC, 0.2 ml of substrate, and 0.5 ml of cell suspension. Since the tests were conducted in the same day and in relatively short times, strict sterile measures were not taken. Each run for each incubation period consisted of a series of 17 tubes for the different substrates and one control for endogenous activity with 0.2 ml of redistilled water instead of substrate. In addition, another tube (blank for the extraction) had 0.3 ml of buffer, 0.2 ml of redistilled

water, and 0.5 ml of cell suspension; with four periods of incubation, for instance, 17 x 4 tubes were utilized plus the controls. The reagents were mixed gently and the tubes transferred from the cold to a precision water bath at 37 C; the incubation time was measured from this moment on. After 1, 2, 3, and 4 hours the tubes of each run were removed from the bath to the cold and one drop of 30% formaldehyde solution was added to each; then they were rubber stoppered and kept in the dark in the refrigerator at 4C, until the extraction of the formazan produced.

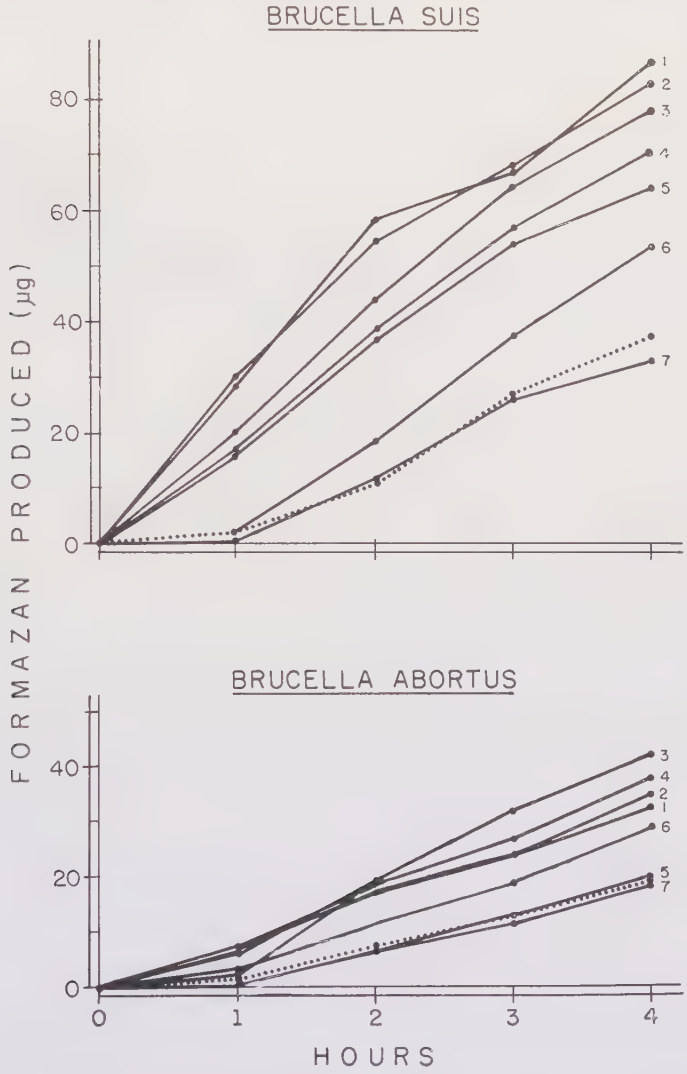


Fig. 1 — Formazan produced by washed cells of *Br. suis* and *Br. abortus* in the presence of: 1 — D-xylose; 2 — D-glucose; 3 — L-arabinose; 4 — D-galactose; 5 — maltose; 6 — D-fructose; 7 — D-lactose.
.....: endogenous activity.

Subjective readings were made after the removal of the tubes from the water bath. This procedure, however, permitted only the observation of gross differences, so formazan extractions were made one or two days after, because it was not possible to do so in the same day of the tests. Each tube received 4 ml of pure acetone and was vigorously shaken and centrifuged at 3000 rpm for 20 minutes; part of the clear supernatant was transferred to matched 13 x 100 Kimble test tubes. Readings were made in the Klett-Summerson photoclectric colorimeter with filter violet 42; the blank was the supernatant of the second control tube without TTC. Not less than two readings were made; the average was recorded and compared with readings obtained with standard formazan solutions.

For the measurement of dehydrogenase activity in micrograms of formazan produced, graded amounts of pure formazan were diluted in 80% acetone and the readings in the colorimeter plotted as a linear function of the concentration (Kun *et al.*, 1949; Nordmann *et al.*, 1951; Fahmy *et al.*, 1952). To obtain the formazan an arbitrary amount of 2, 3, 5 — triphenyltetrazolium chloride was diluted in water and an excess of ascorbic acid and normal sodium hydroxide solutions was

TABLE 1

Formazan production by washed cells of Brucella abortus **and** Brucella suis **in the presence of various carbohydrates**

SUBSTRATE	μg FORMAZAN PRODUCED*							
	Brucella abortus				Brucella suis			
	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	1 h	2 hr	3 hr	4 hr
L—arabinose	2.2	19	31.4	41.6	20	43.8	64.3	78.5
D—fructose	3.1	11.1	18.6	28.5	2	18.7	37.6	53.9
D—galactose	6.4	18.2	26.6	37.7	16.6	38.6	56.8	70.9
D—glucose	6.2	17.1	23.7	34.4	29.8	54.8	68.2	83.2
D—lactose	0.4	7.3	11.7	18.3	0	11.2	26.6	32.9
Maltose	0.6	6.7	12.6	19.3	16.3	37	54.1	64.7
D—xylose	6.9	16.7	23.9	32.4	28.5	58.3	67.5	87.1
None**	1.1	7.2	12	19.2	2.5	10.8	27	37.5

Composition of test systems: 0.5 ml of cell suspension + 0.2 ml of M/50 substrate + 0.1 ml of 0.1% TTC + 0.2 ml of M/15 potassium phosphate buffer, pH 7.0.

* Each value given is the average of four independent experiments for *Brucella abortus* and of three for *Brucella suis*.

** Endogenous activity.

added; after about 10 minutes the dark crystals of formazan were separated by centrifugation, washed twice in distilled water, and diluted in a mixture of equal parts of acetone and methanol; the solvent was evaporated and the dried formazan kept in the dark. Attempts for obtaining a total reduction of graded amounts of tetrazolium with crystals or saturated solution of sodium hydrosulfide, which could be used as standards (Gots *et al.*, 1952; Kun *et al.*, 1949) were unsuccessful because each time gross uncontrolable differences were observed. This is in agreement with observations reported by Bodine *et al.* (1949) and Nordmann *et al.* (1951).

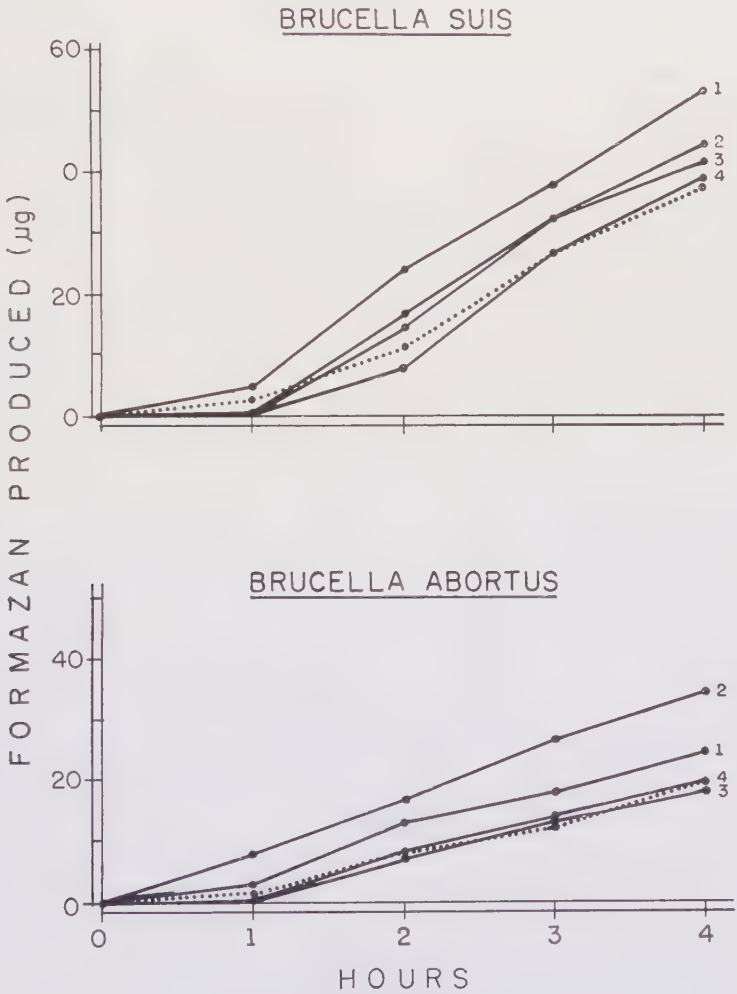


Fig. 2 — Formazan produced by washed cells of *Br. suis* and *Br. abortus* in the presence of: 1 — D-sorbitol; 2 — glycerol; 3 — D-mannitol; 4 — i-inositol.
.....: endogenous activity.

Observation of the sites of more intense enzymatic activity — The same colored cell suspension of the tests was examined microscopically for the sites of more intense enzymatic activity. Sometimes a loopful of 48-hour cultures of *Br. abortus*, *Br. suis*, or *Br. melitensis* was suspended in buffered solution of 0.1 or 1.0% TTC and incubated in the water bath until intense reduction occurred. The microscopy of the cells was made directly with the colored suspension or with a mixture of it and melted agar, between microscopic slide and cover slip. A Zeiss microscope with 10 or 15 X eyepiece and 90 X oil immersion objective of n.a. 1.25 with built-in diaphragm was used. Illumination was provided by a Bausch and Lomb research microscope lamp with a green filter interposed.

TABLE 2

Formazan production by washed cells of Brucella abortus **and** Brucella suis **in the presence of glycerol, i-inositol, Dr-mannitol, and D-sorbitol**

SUBSTRATE	μg FORMAZAN PRODUCED*							
	Brucella abortus				Brucella suis			
	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
Glycerol	8	16.5	26	33.7	0.6	16.2	32	44.5
i—inositol	0.5	7.7	13.5	19	0.7	7.4	26.1	38.8
D—mannitol	0	7	12.6	17.9	0	14.2	32.1	41.8
D—sorbitol	2.6	12.4	17.1	24	4.5	23.7	37.8	53.7
None**	1.1	7.2	12	19.2	2.5	10.8	27	37.5

See footnotes of Table 1.

TABLE 3

Formazan production by washed cells of Brucella abortus **and** Brucella suis **in the presence of DL-alanine, D-arginine, L-asparagine, D-glutamic acid, and glycine**

SUBSTRATE	μg FORMAZAN PRODUCED*							
	Brucella abortus				Brucella suis			
	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
DL—alanine	6.3	14.3	20.6	29.7	9.9	32.6	52.5	68
D—arginine	0.4	7.2	11.6	18.6	0.8	14.8	34	43
L—asparagine	1.9	9.5	13.8	20.8	0.9	11.4	28.6	40
D—glutamic acid	1.8	10.7	11.9	18.9	3	16.8	29	39.4
Glycine	0	7.7	12.9	20.8	0.4	17.4	35.5	54.3
None**	1.1	7.2	12	19.2	2.5	10.8	27	37.5

See footnotes of Table 1.

RESULTS

Dehydrogenase activity — This activity was measured as the amount of formazan obtained in 1, 2, 3, and 4 hours with *Br. abortus* and *Br. suis,* in 4 and 3 independent series of tests, respectively. The results were compared with those obtained as a consequence of the endogenous activity of the same cell suspension.

Carbohydrates: In general, the compounds were more intensely oxidized by *Br. suis* than by *Br. abortus* (Table 1 and fig. 1). D-xylose, L-arabinose, D-glucose, D-galactose, and maltose were actively oxidized;

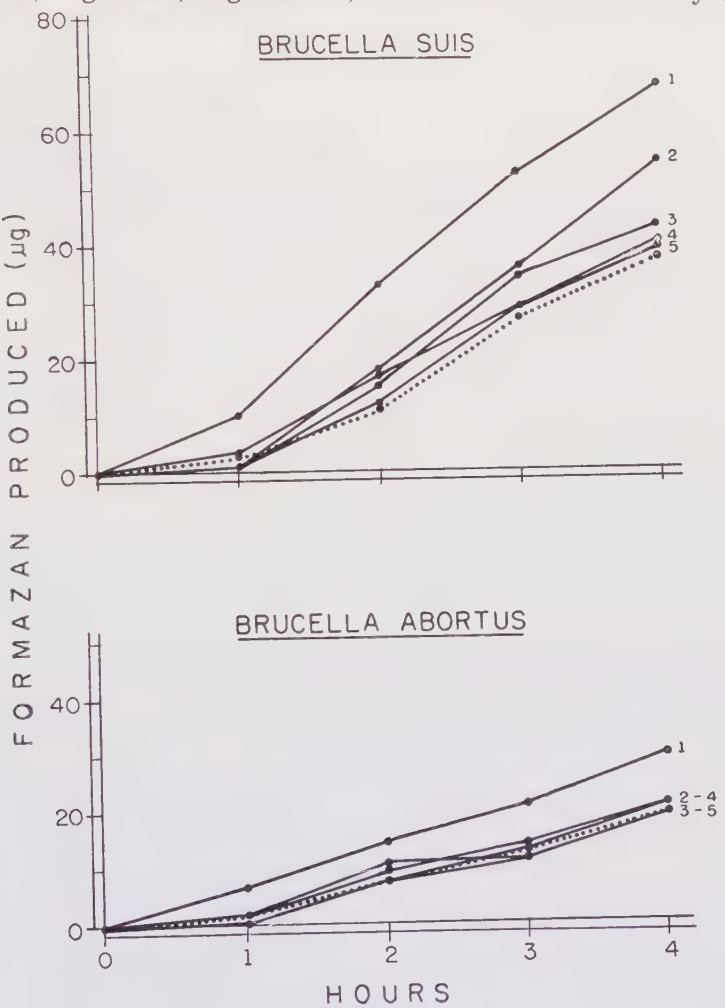


Fig. 3 — Formazan produced by washed cells of *Br. suis* and *Br. abortus* in the presence of: 1 — DL-alanine; 2 — glycine; 3 — D-arginine; 4 — L-asparagine; 5 — D-glutamic acid.
.....: endogenous activity.

D-fructose was slightly oxidized, and D-lactose was not oxidized by *Br. suis*. L-arabinose, D-galactose, D-glucose, D-xylose, and D-fructose were oxidized, and maltose and D-lactose were not oxidized by *Br. abortus*.

Alchools: *Brucella suis* was not very active in oxidizing the alchools employed; only D-sorbitol was slightly oxidized. *Brucella abortus*, however, oxidized intensely glycerol and slightly D-sorbitol (Table 2 and fig. 2).

Amino acids: Only DL-alanine was intensely oxidized by *Br. suis* and *Br. abortus*. Glycine was slightly oxidized by *Br. suis*. The other, amino acids were not oxidized (Table 3 and fig. 3).

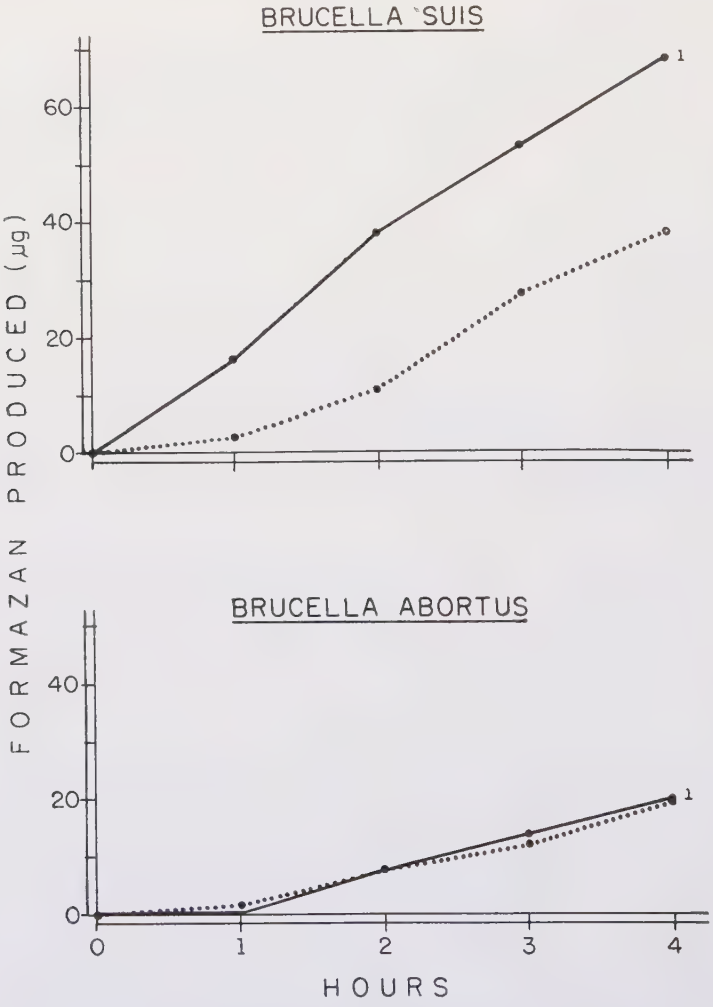


Fig. 4 — Formazan produced by washed cells of *Br. suis* and *Br. abortus* in the presence of: 1 — sodium acetate. .....: endogenous activity.

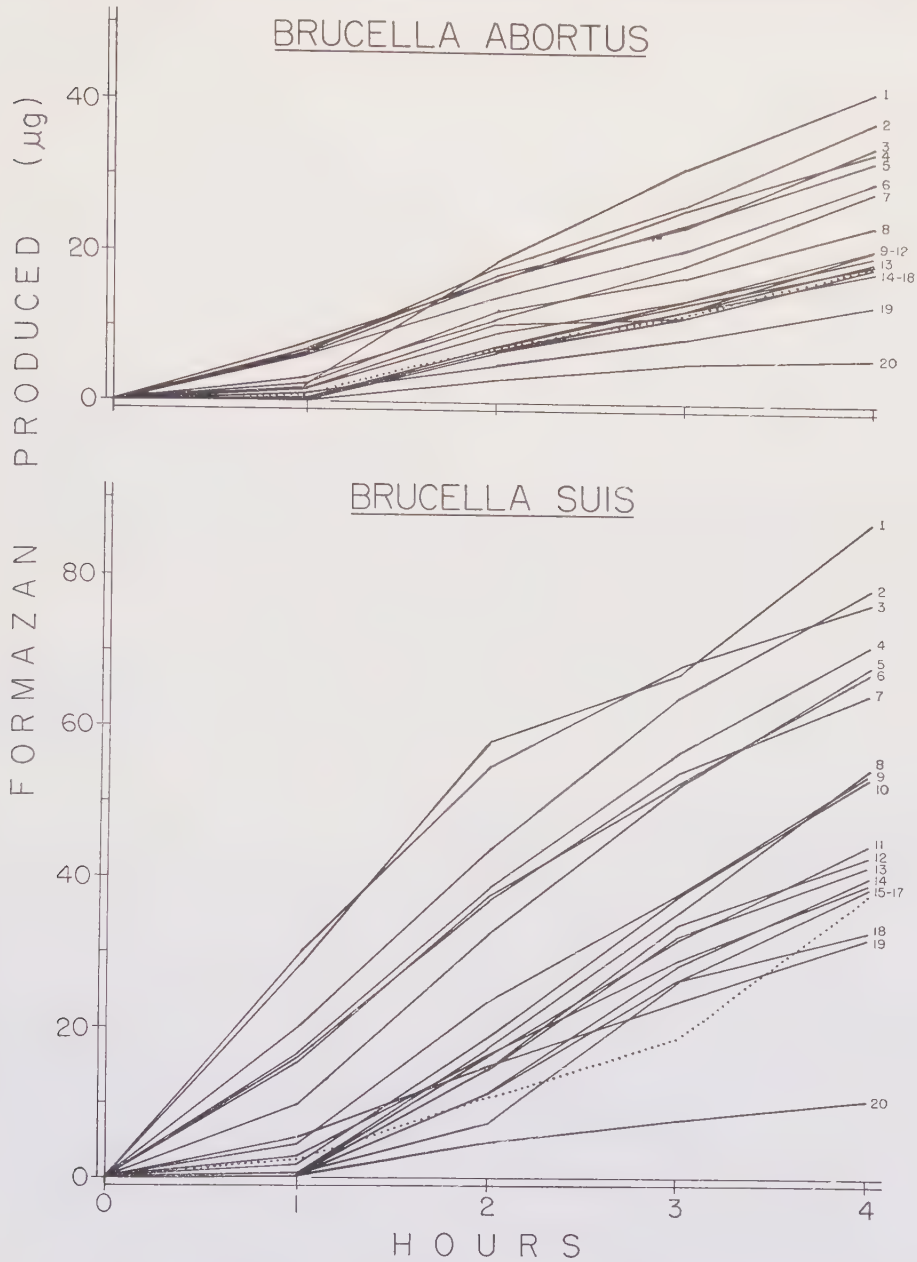


Fig. 5 — Decreasing order of amount of formazan produced by washed cells of *Br. suis* and *Br. abortus* in the presence of 19 single substrates: *Brucella abortus*: 1 — L-arabinose; 2 — D-galactose; 3 — D-glucose; 4 — glycerol; 5 — D-xylose; 6 — DL-alanine; 7 — D-fructose; 8 — D-sorbitol; 9 — glycine; 10 — L-asparagine; 11 — sodium acetate; 12 — maltose; 13 — control; 14 — i-inositol; 15 — D-glutamic acid; 16 — D-arginine; 17 — D-lactose; 18 — D-mannitol; 19 — succinic acid; 20 — citric acid. *Brucella suis*: 1 — D-xylose; 2 — L-arabinose; 3 — D-glucose; 4 — D-galactose; 5 — DL-alanine; 6 — sodium acetate; 7 — maltose; 8 — glycine; 9 — D-fructose; 10 — D-sorbitol; 11 — glycerol; 12 — D-arginine; 13 — D-mannitol; 14 — L-asparagine; 15 — D-glutamic acid; 16 — i-inositol; — 17 — control; 18 — D-lactose; 19 — succinic acid; 20 — citric acid.

Sodium acetate was intensely oxidized by *Br. suis* but not by *Br. abortus* (Table 4 and fig. 4).

TABLE 4

Formazan production by washed cells of Brucella abortus **and** Brucella suis **in the presence of sodium acetate**

SUBSTRATE	μg FORMAZAN PRODUCED*							
	Brucella abortus				Brucella suis			
	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
Sodium acetate	0.6	7.5	13.8	19.9	15.8	37.6	52.7	67.2
None**	1.1	7.2	12	19.2	2.5	10.8	27	37.5

See footnotes of Table 1.

In a general manner the dehydrogenase activity of *Br. suis* was much more intense than that of *Br. abortus* (fig. 5).

Sites of more intense enzymatic activity — The microscopic observation of the cells showed in each of them a small, round and subterminal granule. Some cells did not bear a granule and the largest ones sometimes showed a granule in each end; these were, perhaps, in division. The granules are red and can be easily seen when a green filter is interposed.

DISCUSSION

In our experiments some results were in agreement and others disagreed with recent reports on enzymatic activity of *Brucellae*. The differences are perhaps related to the different techniques employed, since manometric methods were used by the authors of those papers.

Our results agree with those obtained by McCullough & Beal (1951, 1952) who studied the oxidation of 9 carbohydrates by twelve different strains of the three species of *Brucella* and its inhibition by certain antibiotics. In a general manner carbohydrates are more intensely oxidized by *Br. suis* than by *Br. abortus*. It is interesting to mention that the carbohydrates most intensely oxidized by both strains tested by us were those already known as being utilized by *Brucellae*, v.g. arabinose, galactose, glucose, fructose, and xylose (Coleman *et al.*, 1930; Mallardo, 1930; Mc Nutt *et al.*, 1931; Mc Alpine *et al.*, 1928).

Altenbern *et al.* (1952) observed the same rate of oxidation of glucose and sodium acetate at pH 7.4 by *Br. abortus* strain 19. In our

experiments, however, sodium acetate was not oxidized by *Br. abortus*, in contrast with its intense oxidation in presence of *Br. suis*.

Our results are also in disagreement with those of MARR *et al.* (1952) who observed that oxidation of glutamic acid by *Br. abortus* strain 19 was the most rapid metabolic reaction thus far studied in that species. In our experiments D-glutamic acid was not oxidized by neither of the strains used, a fact that confirms observations made by others (HOYER, 1950).

As to the red stained granules within the cells they may possibly be interpreted as mitochondria similar to identical structures observed by some investigators in other microorganisms (MUDD *et al.*, 1951 a, b, c, d; 1952; WINKLER, 1950; WINTERSCHEID *et al.*, 1952).

Acknowledgements — The authors are indebted to Dr. H. Moussatché and Dr. A. Cury for the many suggestions during the course of this investigation, and to Dr. A. C. Perissê for the synthesis of 2, 3, 5 — triphenyltetrazolium chloride utilized in the early stages of the experiments.

SUMMARY

Experiments for the investigation of dehydrogenase activity of washed cells of a strain of *Br. abortus* and another of *Br. suis* in presence of different single added substrates are reported. The activity was measured as the amount of formazan produced by the reduction of 2, 3, 5—triphenyltetrazolium chloride acting as a hydrogen ions acceptor, at pH 7.0.

In a general manner the dehydrogenase activity of *Br. suis* was much more intense than that of *Br. abortus* (fig. 5).

In the conditions of the experiments *Br. abortus* oxidized L-arabinose, D-galactose, D-glucose, glycerol, D-xylose, DL-alanine, D-fructose, and D-sorbitol. *Brucella suis* oxidized D-xylose, L-arabinose, D-glucose, D-galactose, DL-alanine, sodium acetate, maltose, glycine, D-fructose, and D-sorbitol.

Glycerol was oxidized by *Br. abortus* but its oxidation by *Br. suis* was very slight. Sodium acetate and maltose were intensely oxidized by *Br. suis* but not by *Br. abortus*.

The sites of more intense enzymatic activity were seen as small red colored round granules located in one pole of the cells.

SUMÁRIO

O EMPRÊGO DO CLORETO DE TRIFENILTETRAZÓLIO NO ESTUDO DA ATIVIDADE DEHIDROGENÁSICA DE BRUCELAS

Com a finalidade de observar a atividade dehidrogenásica de brucelas, em presença de diversos substratos isolados, empregamos o cloreto de trifeniltetrazólio (em solução aquosa a 0,1%) como receptor de hi-

drogênio. Os substratos (em solução aquosa M 50) foram os seguintes: Hidratos de carbono: L-arabinose, D-frutose, D-galactose, D-glucose, D--lactose, maltose e D-xilose; alcoóis: glicerol, L-inositol, D-manitol e D-sorbitol; ácidos aminados: ácido D-glutâmico, D-arginina, DL-alanina, L-asparagina e glicina; acetato de sódio.

Empregamos suspensões de culturas de 48 horas de duas amostras típicas: *Brucella abortus* (aeróbia, n.º 1 868, amostra B-99, Weybridge) e *Br. suis* (n.º 1 568, amostra SIG do Dr. S. S. Elberg, da Universidade de Califórnia). As culturas em agar, lavadas 5 vêzes em solução de cloreto de sódio a 0,9% ("resting cells") foram suspensas nessa solução salina de maneira a dar uma leitura de 100 na escala do colorímetro fotoelétrico de Klett-Summerson, quando diluídas a 1:20. O tampão utilizado nas provas era de fosfatos em solução M/15, a pH 7.0. Cada tubo de prova continha 0,2 ml de tampão, 0,1 ml de tetrazólio, 0,2 ml de substrato e 0,5 ml de suspensão de brucelas; um testemunho levava 0,2 ml de água destilada em vez de substrato e outro, mais 0,1 de tampão, em vez de tetrazólio ("blank" para a extração). Incubavam-se os tubos em banho-maria a 37°C retirando-se no fim de 1, 2, 3 e 4 horas; a reação enzimática era estabilizada com uma gota de formol a 30% e os tubos guardados na geladeira, arrolhados.

A formazana resultante da redução do tetrazólio era extraída 1 ou 2 dias depois, com acetona e dosada no colorímetro fotoelétrico K-S, em relação a uma reta padrão prèviamente determinada com formazana pura. Também foram observados os pontos de maior atividade enzimática (provàvelmente mitocôndrias) colocando-se as brucelas, antes da extração da formazana, entre lâmina e lamínula e observando-se ao microscópio com filtro verde.

Os resultados permitiram-nos chegar às seguintes conclusões:

a) De um modo geral *Br. suis* possui atividade dehidrogenásica mais acentuada do que *Br. abortus* (fig. 5).

b) *Br. abortus* oxida mais intensamente os seguintes substratos: arabinose e galactose (muito intensamente), glucose, glicerol, xilose, alanina, frutose e sorbitol (que foi o menos oxidado).

c) *Br. suis* oxida mais intensamente os seguintes substratos, em ordem decrescente: xilose, arabinose e glucose (muito intensamente), galactose, alanina, acetato de sódio, maltose, glicina, frutose e sorbitol.

d) Glicerol não aumenta a atividade dehidrogenásica endógena de *Br. suis* enquanto o acetato de sódio não aumenta esta atividade em *Br. abortus*.

e) Os pontos de maior atividade enzimática são arredondados, muito pequenos, e estão situados numa das extremidades do germe, raramente nas duas.

BIBLIOGRAFIA

ALTENBERN, A.A. & HOUSEWRIGHT, R.D., 1952, Carbohydrate oxidation and citric acid synthesis by smooth *Brucella abortus*, strain 19. *Arch. Biochem. Bioph.*, 36: 345-356.

ANTOPOL, W., GLAUBACH, S. & GOLDMAN, L., 1948, Effects of a new tetrazolium derivative on tissue, bacteria and onion root tips. *Publ. Hlth. Rep.*, 63: 1231-1238.

BENDTSEN, H., 1949, A new method for staining of living bacteria, spermia, etc., particularly serviceable for the preparation of Brucella ring-test antigen. *Nord. Vet.-Med.*, 1: 915-919; WHO/FAO Bruc. Inform. Se. n.º 3, 1950.

BENDTSEN, H. 1950, Sensitivity of tetrazolium-stained ring test antigen as compared to other ring test antigens. *Nord. Vet.-Med.*, 2: 604-611; WHO/FAO Bruc. Inform. Se. n.º 10, 1950.

BIELIG, H.J., KAUSCHE, G.A. & HAARDICK, H., 1949, Über den Nachweis von Reduktionsorten in Bakterien. *Z. Naturforsch.*, 4 b: 80-91.

BODINE, J.H. & FITZGERALD, L.H., 1949, The succinic dehydrogenase activity of the grasshopper egg and embryo and the colorimetric triphenyltetrazolium chloride method. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 34: 521-523.

CANIZARES, O. & SHATIN, H., 1951, Studies of dermatophytes in culture media containing 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride. *J. Inv. Dermatol.*, 17: 323-336.

COLEMAN, M.B., OWEN, H.H. & DACEY, H.G., 1930, Fermentation of monosaccharids by organisms of the Abortus-Melitensis group. *J. Lab. Clin. Med.*, 15: 641-642.

FAHMY, A.R. & WALSH, E. O'F., 1952, The quantitative determination of dehydrogenase activity in cell suspensions. *Biochem. J.*, 51: 55-56.

FRED, R.B. & KNIGHT, S.G., 1949, The reduction of 2, 3, 5 — triphenyltetrazolium chloride by *Penicillium chrysogenum Science,* 109: 169-170

GODDARD, J.W. & SELIGMAN, A.M., 1952, Intracellular topography of succinic dehydrogenase in the thyroid of the albino rat. *Anat. Rec.*, 112: 543-559.

GOTS, J.S., JORDAN, V.E. & BRODIE, A.F., 1952, Studies on the action of nitrofurans on bacterial enzyme systems. III. Furacin interference with dye reductions by *Escherichia coli. Arch. Biochem. Bioph.*, 36: 285-298.

GREEN, D.E., 1951, The cyclophorase complex of enzymes. *Biol. Rev.*, 26: 410-453.

HANKS, J.H., 1951, Measurement of the hydrogen transfer capacity of Mycobacteria, *J. Bact.*, 62: 521-528.

HOYER, B.H., 1950, Some aspects of the physiology of *Brucella* organisms. In *Brucelosis, A. Symposium,* pp. 9-25. Amer. Assoc. Adv. Sci., Washington, D.C.

HUDDLESON, I.F. & BALTZER, B., 1950, Differentiation of bacterial species and variation within species by means of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride. *Science,* 112: 651-652.

KUHN, R. & JERCHEL, D., 1941, Über invertseifen. VIII. Reduktion von Tetrazoliusalzer durch Bakterien, gärende Hefe und Keimende Samen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 74(1): 949-952.

KUN, E. & ABOOD, L.G., 1949, Colorimetric estimation of succinic dehydrogenase triphenyltetrazolium chloride. *Science,* 109: 144-146.

LEDERBERG, J., 1948, Detection of fermentative variants with tetrazolium. *J. Bact.*, 56: 695.

MALLARDO, C.A., 1930, The identity of *Brucella abortus* with *Brucella melitensis. J. Trop. Med. Hyg.*, 33: 125-126.

MARR, A.G., OLSEN, C.B., UNGER, H.S. & WILSON, J.B., 1952, The oxidation of glumatic acid by *Brucella abortus. Bact. Proc. Soc. Amer. Bact.*, 152-153.

MC ALPINE, J.G. & SLANETZ, C.A., 1928, Studies on the metabolism of the Abortus-Melitensis group. 3. Glucose utilization *J. Infect. Dis.*, 42: 73-78.

MC CULLOUGH, N.B. & BEAL, G.A., 1951, Growth and manometric studies on carbohydrate utilization of *Brucella. J. Infect. Dis.*, 89: 266-271.

Mc Cullough, N.B. & Beal, G.A., 1952, Antimetabolic action of sulfadiazine and certain antibiotics for *Brucella*. *J. Infect. Dis.*, 90: 196-204.

Mc Nutt, S.H. & Purwin, P., 1931, The acidity produced in *Brucella* cultures. *J. Infect. Dis.*, 48: 292-294.

Mello, M.T., 1951, A tetrazolium stained antigen for serum agglutination tests in brucellosis. *O Hospital*, Rio de Janeiro, 40: 127-131; WHO/FAO Bruc. Inform. Se., n.º 41, 1951.

Moulin, F., 1951, A study on the nature of the abortus Bang ring test. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 76: 905-925.

Mudd, S., Winterscheid, L.C., Delamater, E.D. & Henderson, H.J., 1951a, An enzymatic function of the granules of Mycobacteria. *Bact. Proc. Soc. Amer. Bact.*, 43-44.

Mudd, S., Winterscheid, L.C. & Brodie, A.F., 1951b, The discovery of mitochondria in bacteria. *Mitt. dtsch. Ges. Elektr.-Micr. In Phys. Blätter*, 4: 79-80.

Mudd, S., Winterscheid, L.C., Delamare, E.D. & Henderson, H.J., 1951c, Evidence suggesting that the granules of Mycobacteria are mitochondria. *J. Bact.*, 62: 459-475.

Mudd, S., Brodie, A.F., Wintercheid, L.C., Hartman, P.E., Beutner, E.H. & Mc Lean, R.A., 1951d, Further evidence of the existence of mitochondria in bacteria. *J. Bact.*, 62: 729-739.

Mudd, S., Hillier, J., Hartman, P.E. & Beutner, E.H., 1952, Electron and light microscopic observations on phage replication under controlled conditions. II. Persistence of mitochondria Summary *Bact. Proc. Soc. Amer. Bact.*, 69.

Narahara, H.T., Quittner, H., Goldman, L. & Antopol, W., 1950, The use of neotetrazolium in the study of *E. coli* metabolism. *Trans. New York Acad. Sci.*, 12: 160-161.

Nordmann, J., Nordmann, R. & Gauchery, O., 1951, Détermination de l'activité déshydrogénasique des mitochondries a l'aide du chlorure de 2, 3, 5, triphenyltétrazolium. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33: 1827-1836.

Shelton, E. & Schneider, W.C., 1952, On the usefulness of tetrazolium salts as histochemical indicators of dehydrogenase activity. *Anat. Rec.*, 112: 61-81.

Winkler, A., 1950, Zur Anwendung des Phasenkontrastverfahren in der Bakteriologie. *Z. Naturforsch.*, 6 b: 72-76.

Winterscheid, L.C. & Mudd, S., 1952, The mitochondria and nuclei of Mycobacteria. *Bact. Proc. Soc. Amer. Bact.*, 27-28.

Wood, R.M., 1950, Brucella ring test antigen prepared by reduction of a tetrazolium salt. *Science*, 112: 86.

Sensibility of the hamster (*Cricetus auratus*) to the *Treponema pertenue*

F. Nery-Guimarães
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D.F.

(With one text-figure)

Yaws experiments on rodents are not as numerous as those on syphilis; there are however many papers on the subject. Usually, several strains of treponemae under artificial cultivation are employed and considered as *T. pertenue*. The most commonly used is the so-called "Nichols' strain". The infections that develop in the rodents are irregular and symptomless. Injections of emulsified tissues from the experimental rodents into rabbits' testis, provoke specific lesions. Probably, the natural occurrence of *T. cuniculi* in rabbits has interfered in several of these experiments. On the other hand, after numerous transfers during many years the treponemae have adapted themselves to the rabbit's organism. For us it has been very difficult to provoke positive treponemae lesions in rabbit's testis by injecting material from the human yaws lesions. In the same way, neither neurotropism nor viscerotropism in mice grafted with fragments of yaws lesions could be obtained.

In this paper we report experiments with Hamsters in which there was injected material from infectious yaws lesions, there being obtained local and methastatic positive treponemae lesions.

At the First Yaws Symposium in Bangkok (Thailand) in March 1952, photographs of these lesions in the Hamsters were exhibited and at the Tropical Medicine Congress in Lisbon there was made a communication in that same year. Turner and others in the mentioned *Yaws Symposium* presented a paper in which they reported yaws lesions in experimentally infected hamsters. Recently, Hill & Gordon also provoked experimental yaws lesions in the Hamsters.

EXPERIMENTS. MATERIAL AND METHODS

1) With material from a yaws patient, on May 9, 1951, six Hamsters were injected: two into the testis, two on the scrotum skin

and two into the peritoneal cavity. The inoculum was prepared as follows: a typical papilloma with treponemae was biopsed. After several washings it was triturated and emulsioned in saline. Each animal received 0,5 ml of this emulsion.

Fig. 1 — Experimental yaws lesions in 4 Hamsters, two on the muzzles and two on the prepuce and testicle.

Summary of the records

Hamster N.º 2 000 — Injected in the left testicle. After 45 days the organ presented a larger volume and lesions on the scrotum were noticed. These lesions were superficial, erythematous and scamous. It developed progressively, finally reaching the prepuce and tail. Almost at the same time there appeared a nasal lesion, crusty and yellowish, which also developed until it took over all the muzzle. Both lesions contained typical treponemae. The animal died on August 1, 1951, (82 days after it had been inoculated). At the autopsy the examination of the internal organs was negative (brain, spleen, liver, kidney and inguinal lymph node).

Hamster N.º 2 002 — Injected into the left testicle. The incubation period was shorter than the former (35 days) and development was altogether the same. The scrotal lesion as the nasal one, contained numerous treponemae, the latter one presenting a typical clinical aspect of framboesiome. The animal died on August, 22,1951 (104 days after it had been injected). At the autopsy the examination of the internal organs was negative.

Hamster N.º 2 001 — Injected on the scrotum (left side). After 50 days there appeared a superficial, red and highly erosive lesion. It spread widely occupying all the scrotum and reaching the groins, prepuce and tail, on which great ulceration could be noticed. After 70 days it developed a lesion on the hinder right paw which became finally destroyed. Together with the paw lesion appeared another one on the muzzle which also contained treponemae. These were also present in the scrotal lesion. The animal died on August 7, 1951 (88 days after the inoculation). The autopsy revealed no treponemae in the internal organs. With material from spleen, lymph node and brain emulsioned in saline, 3 normal Hamsters were inoculated into the testis, each animal receiving one of the mentioned organs. These animals, under observation for more than 5 months, did not develop any lesion. (Hamsters: N.º 2 003, N.º 2 005 and N.º 2 006).

Hamster N.º 2 007 — Injected into the scrotum. After 60 days it also developed scrotal and nasal lesions. The former also spread widely. Treponemae were present in all the lesions .After 160 days the scrotum lesion had healed completely there remaining a pigmented scar only. At this time, there appeared on the palm surface of the hinder paws lesions covered by yellow crusts and containing treponemae. These lesions healed completely, but appeared again. The animal survived for a long time. On January 30, 1952 (235 after inoculation), it was sacrificed by total bleeding (heart puncture). Wasserman's and Kahn's reactions were negative. A normal Hamster was inoculated (testicle) and it died of intercurrence after 23 days (Hamster N.º 2 009).

Hamster N.º 2 004 — Injected into the peritoneal cavity. After 102 days the scrotum lesions also appeared and spread widely. Soon after, there appeared the nasal lesion, which developed greatly, taking the whole muzzle. Both lesions contained treponemae. After 158 days a lesion appeared on the back, with almost one centimeter in diameter and also containing treponemae. This lesion was very much similar to a framboesiome and receded completely in 25 days. On October 31, 1951 (176 days after inoculation) the animal died. The autopsy revealed no treponemae in the internal organs. The scrotum skin was very dark.

Hamster N.º 2 008 — Injected into the peritoneal cavity. After 113 days scrotal and nasal lesions appeared almost simultaneously, both with the same aspect as the former ones. After 133 days a lesion appeared on the back, with a yellow crust which also contained treponemae. This lesion receded completely after a month. On January 30, 1952, the animal was sacrificed by total bleeding (235 days after the inoculation). Wasserman's and Kahn's reactions were negative. With material from the muzzle lesion, a normal Hamster was inoculated into the testicle, and developed scrotal and nasal lesions like the former ones

and with treponemae. It died 72 days after it had been injected. No autopsy was made (Hamster N.º 2 010).

2) With material from another patient with infectious yaws, two Hamsters were inoculated into the left testicle on October 10, 1951. The inoculum was prepared in the same way as in the former experiment.

Summary of the records

Hamster N.º 2 030 — Thirty days after the inoculation there appeared a superficial, erythematous and peeling lesion on the scrotum. It developed on the surface and also in depth, finally ulcerating both testicles. After 55 days the lesions of the muzzle and of the hinder paws (palm surface) appeared. All these lesions contained abundant treponemae. The animal was sacrificed by total bleeding on January 30,1952 (82 days of observation). The autopsy revealed no treponemae in the internal organs. Wasserman's and Kahn's reactions were negative. A normal Hamster was injected into the testicle with material from the muzzle lesion. After 28 days it presented an ulcerous and superficial lesion on the scrotum, which finally took over the testicles. After 60 days it presented the nasal lesion. Treponemae were numerous in all the lesions. After 122 days, it showed methastatic lesions on the back and on the hinder paws, which also contained treponemae. The animal died on June 11, 1952, and no autopsy was made (Hamster N.º 2 032).

Hamster N.º 2 031 — At the same time as in Hamster N.º 2 030, there appeared the scrotal lesion which spread widely, affecting the prepuce, anus and tail, followed by lesions on the hinder paws and muzzle. All these lesions contained treponemae and persisted until January 30, 1952 when the animal was sacrificed by total bleeding. Wasserman's and Kahn's reactions were negative. Researches for treponemae in the internal organs also proved to be negative. A normal Hamster was inoculated into the testicle with material from the muzzle lesion. After 31 days it presented a small lesion with treponemae on the scrotum, and after 43 days it showed the nasal lesion. After 118 days it presented methastatic lesions on the back and hinder paws. It died on July 16, 1952, and no autopsy was made (Hamster N.º 2 033).

Direct contagion

On September 4, 1951, 4 Hamsters with scrotal and prepuce lesions, were matched to 4 normal females. Until 60 days after they had been joined none of the females showed any external lesion that could be suspected. The animals were examined almost every day. On December 3, 1951, (90 days) the female matched to Hamster N.º 2 006, presented a small lesion on the muzzle, in which the research for treponemae was found to be positive. Nine days later, this animal died in complete anasarca. Its autopsy revealed no treponemae in the internal organs. The female matched to the male N. 2 007 died on December 30, 1951 without any suspected external lesion. The third female matched to the male N.º 2 004 developed a nasal lesion by the end of December (more than 100 days after they had been joined). This lesion took the aspect of those described in the inoculated Hamster and the research for treponemae was found positive beginning January 5, 1952. Sacrificed by total bleeding on January 30, 1952, it did not reveal treponemae in

the internal organs and Wasserman's and Kahn's reactions were negative. The last female, matched to male N.º 2 002, under observation during 6 months, always presented a normal appearance. The autopsy revealed no treponemae in the internal organs.

The time the Hamsters had been matched corresponded approximately to the normal time for the species, for this was occurring with Hamsters reared at the Institute. Despite this fact, there was apparently no copula among the couples of the experience. Possibly, the scrotal lesion and specially the prepuce lesion, hindered copulation. On the other hand; it may be that the size of the boxes in which the couples were kept was the cause, since they usually accommodate only one animal. At any rate, if there was copula there was no fecundation.

HISTOPATHOLOGY

Both biopsy and autopsy material was examined, the following being observed: On the scrotum, paws, tail and muzzle skin, there was pronounced hyperacanthosis covered by a purulent fibrin crust. Intraepidermic microabcesses were frequent. The same could be observed in the back lesion. The dermis showed infiltration of mono- and polymorphonuclear cells and also of histiocytes. The edema was at times very intense, and the dilated capillaries presented endothelial hyperplasia. The sections of the muzzle showed deep invasion of the infiltration reaching the chorium of the nasal mucosae, the epithelium of which was disorganised in some spots. By silver impregnation (Levaditi method) a few treponemae were seen in the superficial layers of the epidermis, exactly where the lesions were more intense. Treponemae were not found, either in the other layers of the epidermis or in the dermis. The scarcity of treponemae found in the sections, compared to their abundance in the exams in darkfield, can be attributed to the imperfection of the silver impregnation technique. No treponemae were found in the section of the most important viscera of the animals. However, in the testicle of Hamster N.º 2 030, in which there were found severe degenerative lesions with destruction of the tubules and intense inflammatory exudate, treponemae were seen sometimes in tubular lumen, the epithelium of which was destroyed. Consequently, besides the above mentioned clinical resemblance, the cutaneous lesions observed in the Hamsters showed histopathology similar to that in human yaws lesions.

COMMENTS

Considering that rodents are refractory to experimental inoculation with treponemae usually responding with unapparent and symptomless infections, the sensibility of the Hamster to the *T. pertenue* is worthy of consideration.

In fact, 8 animals inoculated with material obtained directly from human yaws lesions, developed treponemae containing lesions in two

experiments. The testicle inoculation provoked shorter incubation period (35 days), the scrotal via, a longer incubation (55 days), and the peritoneal via one even more so (107 days).

With material from experimental lesions of the Hamsters, positive subinoculations in normal Hamsters were obtained.

From 4 female Hamsters matched to 4 infected male Hamsters, two were infected by direct contagion. The scrotum and prepuce lesions probably hindered copulation. At any rate, if there was copula no fecundation resulted from it.

The experimentally infected Hamsters presented erythematous and peeling ulcerous lesions on the scrotum. These lesions rarely reached the testicle although they spread widely encompassing the tail, groins and prepuce. Proliferative and ulcerous lesions in the muzzle were also observed, resembling framboesiome and methastatic lesions on the hinder (palm surface) and on the back paws, both covered by yellow crusts. In darkfield examination all these lesions were found to contain treponemae.

The nasal lesions can be explained as an auto-contamination but the same cannot be admitted for the back lesions, since they were out of reach of muzzle and nails of the animal.

As to the paw lesions, the repeated occurrence on the posterior members, upon which the animal commonly rests must be pointed out. It is probable that friction helped its formation, as we think is the case with the plantar lesions in the human yaws infections.

Unexpectedly, the serum reactions (Wassermann's and Kahn's) were negative in 5 animals with positive treponemae lesions, two of them with almost 8 months' infection. Possibly, since the perseverance of this negativity can be proved, the reason for this must be of an histochemical nature explained by the possible lack of any principles in these rodents.

In the Hamsters that died or were sacrificed with positive skin lesions for treponemae, these were researched directly in the internal organs (in darkfield and in silver-impregnated sections) always with negative results. With brain, spleen and lymph node of one of them (Hamster N.º 2 001) three normal Hamsters were inoculated, each with one of the referred to organs. None of them presented any specific lesion. Their autopsies revealed no treponemae in the internal organs.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

In two experiments, 8 Hamsters inoculated with material from yaws lesions (*Treponema pertenue*), developed skin lesions considered specific by their clinical and histopathological aspects and by the presence of treponemae. These lesions appeared on the scrotum, testicle, prepuce, anus, tail, muzzle, back and hinder paws (palm surface). In the internal organs no treponemae were found in direct examinations and inoculation of brain, spleen and lymph node. The incubation period was of 35

days for the testicle, 55 days for the scrotum and 107 days for peritoneal cavity inoculation. Positive sub-inoculations were obtained. The serum reactions (Wasserman's and Kahn's) were negative in all 5 tested Hamsters.

Out of 4 normal females matched to infected males two developed nasal lesions resulting from direct contact. Apparently the genital lesions hindered copulation.

Hamsters are very well suited for an experimental study of yaws.

RESUMO E CONCLUSÕES

Em 2 experiências, 8 Hamsters inoculados com material direto de lesões boubáticas (*Treponema pertenue*), desenvolveram lesões cutâneas consideradas específicas, pelo aspecto clínico e histopatológico e pela presença de treponemas. Essas lesões se manifestaram no escrôto, testículo, prepúcio, anus, cauda, focinho, dorso e patas posteriores (face palmar). Nos órgãos internos não foram vistos treponemas ao exame direto e, uma vez, por inoculação de cérebro, baço e gânglio linfático. O período incubativo foi de 35 dias pela via testicular, 55 dias pela via escrotal e 107 dias pela via peritonial. Foram obtidas sub-inoculações positivas para Hamsters normais. As experiências continuam.

De 4 fêmeas normais, acasaladas com 4 hamsters infectados apenas 2 mostraram lesões positivas resultantes de contágio direto. Aparentemente, não houve copulação e, se esta ocorreu, não determinou fecundação.

BIBLIOGRAFIA

Da Cunha, A.M. & Nery Guimarães, F., 1945, Ausência de Neurotropismo e Viscerotropismo do *Treponema pertenue* no Organismo de Camundongos Inoculados. *Brasil-Médico,* 59 (48-50).

Hill, K.R. & Gordon, C.C., 1954, Experimental Yaws in the Hamster. *WHO,* Int./Vd./72, March 16.

Turner, T.B., Hollander, D.H. & Schaeffer, K., 1953, Biological Investigations on Treponemes. *Bull. WHO,* 8: 7-16.

Estudos anatômicos e histológicos do ducto intestinal de *Embolyntha batesi* MacLachlan, 1877 (*Embiidina*)

Rudolf Barth e **Dyrce Lacombe**
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D.F.

(Com 34 figuras no texto)

INTRODUÇÃO

Em comparação com as outras ordens de insetos, os *Embiidina* constituem um grupo muito pequeno, sendo fàcilmente distinguidos pela forma de seu corpo e seu modo de vida. A bibliografia existente sôbre *Embiidina* trata, na maioria das vêzes, de sua morfologia e sistemática, enquanto que sua anatomia e histologia são pouco conhecidas. Até hoje estão descritas apenas pouco mais de 100 espécies; tôdas sem importância econômica, daí decorrendo, provàvelmente, os poucos estudos feitos sôbre a ordem.

Devemos levar em consideração o que BARTH (1945) menciona, isto é, que o material para pesquisa raramente chega às mãos dos cientistas europeus em conservação adequada. Apenas algumas espécies são encontradas no Sul e Suleste da Europa, enquanto a maioria vive em regiões tropicais. O material aqui descrito foi coletado em Sepetiba, (Distrito Federal) em uma região litorânea, aproximadamente a 70 km do Rio de Janeiro, vivendo agrupados em galerias de sêda por êles fabricadas, sôbre o tronco da jaqueira (*Artocarpus integrifolia*).

O clima de Sepetiba é marinho e quente. Durante a época de reprodução dêsses animais torna-se úmido, porém no inverno é relativamente sêco. Os *Embiidina* por serem pouco protegidos contra a perda de água, formam, através de suas construções em galerias, um micro-clima adequado. COSTA LIMA (*Insetos do Brasil*, vol. 1, pág. 112, fig. 55) nos dá uma boa ilustração de colônias de *Embiidae*.

A determinação da espécie com que trabalhamos foi feita pelo prof. COSTA LIMA, à quem agradecemos penhoradamente.

TÉCNICAS USADAS

Para as preparações das partes bucais foi empregado o método de clarificação segundo SPALTEHOLZ. Para o estudo anatômico do tubo

digestivo, o inseto foi sacrificado, fixado à placa de Petri por meio de alfinetes e, depois, aberto dorsalmente. O fixador usado para o intestino *in situ* foi o de Carnoy. Após 10 minutos, o material foi hidratado e corado pela hematoxilina de DELAFIELD, durante 6 minutos; a seguir lavado em água e desidratado. Para a preparação de material histológico foram usados vários fixadores: líquido de Carnoy com sublimado (junta-se 1 g de sublimado para cada 100 cm^3 de álcool absoluto, segundo WEBER), Bouin, Gilson, e de Flemming. Com os 3 primeiros o inseto foi fixado inteiro; com o de Flemming sòmente o tubo digestivo. Nos casos dos fixadores de Bouin Gilson e Carnoy as colorações mais usadas foram: hematoxilina de Delafield, cromotrop, vermelho congo, verde luz. Usando o Flemming como fixador, a coloração mais adequada foi a hematoxilina férrica de Heidenhain. Maiores informações serão encontradas em BARTH (1953).

MORFOLOGIA GERAL

O aspecto do corpo dos *Embiidina* é muito uniforme. As grandes variações encontradas em outros insetos, principalmente nos das regiões tropicais, não se verificam neste pequeno grupo. Essa uniformidade deve estar ligada à maneira de viver, característica dêsses animais, isto é, em tubos ou galerias de sêda.

Fig. 1 — *Embolyntha batesi*, fêmea.

Correspondendo ao habitat, o corpo é alongado, achatado dorso-ventralmente (fig. 1). O comprimento total é de 12 mm (fêmea). Quando em repouso, as asas dos machos encostam-se dorsalmente, no corpo, de modo que elas não impedem o movimento dêsses animais dentro das suas galerias.

A cabeça é formada por escleritos cujos limites não são visíveis. E' a porção mais resistente do inseto; sendo o contrário do que se observa no tórax e no abdômen, onde a cutícula é menos reforçada. E' totalmente revestida de pequenas cerdas. Na fig. 9 são apresentadas as regiões do vértex, fronte, clípeo e labro e, ainda, os olhos e as antenas filiformes, com um número de segmentos variável entre 25 e 30.

Dos 3 segmentos torácicos o protórax é o menor, sendo o mesotórax e o metatórax aproximadamente do mesmo tamanho. Nos machos os tergitos do protórax e do mesotórax possuem uma forma triangular, enquanto que nas fêmeas são aproximadamente retangulares. Os três pares de patas são de forma diferente, conforme sua função habitual: o primeiro par possui dentro dos tarsos glândulas volumosas, siricigê-

nicas, para formação das galerias; o segundo par serve de apôio para as paredes das galerias, durante a locomoção; enquanto o terceiro par serve exclusivamente para a locomoção, sendo também a pata mais forte (Barth 1954). No macho o mesotórax e o metatórax possuem um par de asas que são de coloração escura e de nervuras longitudinais acentuadas (fig. 2). Sua base é pedunculada, a superfície áspera e tomada por numerosas cerdas diminutas.

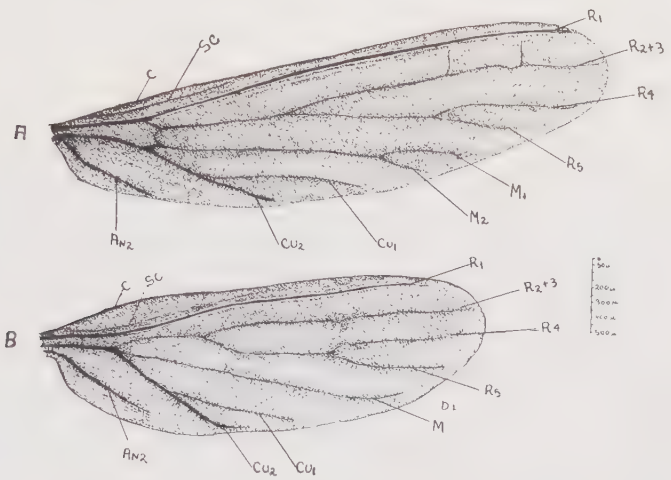


Fig. 2 — Asa anterior (a) e asa posterior (b). (AN2 = segunda anal C = costal; CU1-2 = primeira e segunda cubital; M1-2 = primeira e segunda mediana; R1-5 = primeira a quinta radial; Sc = subcosta).

O abdômen é alongado e possui 10 segmentos bem visíveis. O par de cercos na extremidade, é simétrico nas fêmeas e assimétrico nos machos. Nos machos, os cercos funcionam como aparêlho auxiliar no ato da cópula.

MICROANATOMIA DO TUBO DIGESTIVO

Partes do estomodeu

O tubo digestivo, de forma mais ou menos reta, está situado medianamente, indo da cavidade bucal até ao ânus (fig. 3). Compõe-se de: cavidade bucal com as partes bucais, faringe, esôfago, inglúvia, proventrículo, que vão corresponder às partes do estomodeu; intestino médio correspondendo ao ênteron; e piloro, íleo, intestino grosso, reto e ânus que vão corresponder às partes do proctodeu. No fechamento do ânus participam, o restante das placas segmentares do 11.º segmento, o epiprocto e o paraprocto.

Partes bucais

1. *Labro* (fig. 4) — É formado por uma larga dobra do tegumento, estando localizado em seguida ao clípeo. Cobre dorsalmente, na maioria das vêzes, as demais partes bucais. Sua superfície é recoberta por numerosas cerdas pequenas, idênticas às que recobrem a cabeça. Na porção inferior do labro (fig. 5) há duas fileiras de sensílas (SN) que aumentam de tamanho a partir da base do labro para a sua extremidade. Nos ângulos laterais basais, de cada lado, estão situados grupos de 5 sensílas (CR), que servem provàvelmente, para o contrôle do alimento. Ainda no bordo anterior do labro encontra-se uma franja de cerdas rígidas.

2. *Mandíbulas* (fig. 6) — Estão situadas abaixo do labro e são as partes da cavidade bucal mais cuticularizadas. Possuem dentes poderosos, dos quais os dois superiores — incisivos (IC) — são, consideràvelmente, mais fortes que os inferiores — molares (MO). Elas se inserem no bordo lateral da cápsula craniana, na região das genas.

3. *Maxilas* (fig. 7) — Às mandíbulas seguem, como segundo par das partes bucais, as maxilas. O artículo basal, o cardo (CA), relativamente pequeno, faz um ângulo reto com o eixo longitudinal da cabeça, enquanto que, as partes restantes das maxilas estão situadas paralelamente ao eixo. Acima do cardo fica o estipe (ST), uma peça mais volumosa e forte, podendo mover-se em sentido transversal por meio de sua articulação basal. No seu ângulo externo distal insere-se o palpifer (PA), que representa o segmento basal do palpo maxilar (PMA). Êste é plurisegmentado (5 segmentos), e recoberto por numerosas cerdas e sensílas. No ângulo interno distal do estipe encontra-se a lacínia (LA), que possui na sua extremidade dois dentes fortes, bem esclerosados e escuros, e, em sua parte interna há uma fileira longitudinal de sensílas com inserções grandes. Entre o palpo e a lacínia fica situada a articulação da gálea (GA). Esta, é simples, curvada, unisegmentada e, não possui cerdas ou sensílas; sua fragilidade nos dá a impressão de ter, apenas, uma função secundária.

4. *Lábio* (fig. 8) — É uma peça secundàriamente ímpar, que limita e protege as partes bucais situadas acima dêle. Compreende uma parte basal que se insere na gula. Esta (fig. 10, GU) recobre, inferiormente, o forame ocipital (FO). Na extremidade do submento (SB) temos o premento (PM). Nos seus ângulos externos vão se inserir os palpos labiais. Quando se observam, ventralmente, as partes bucais, pode-se distinguir o palpo labial (PLA) do maxilar (PM) pelo número de segmentos que, nos labiais são de três, enquanto que nos maxilares são de cinco (fig. 10). Ainda nas extremidades do premento, existem

as paraglossas (PG), que são relativamente fortes e recobertas por cerdas na sua porção apical. As paraglossas, quando fechadas, aumentam a área do lábio. As glossas (GL) são menores e encontram-se entre as paraglossas, sendo recobertas, parcialmente por estas. A principal fun-

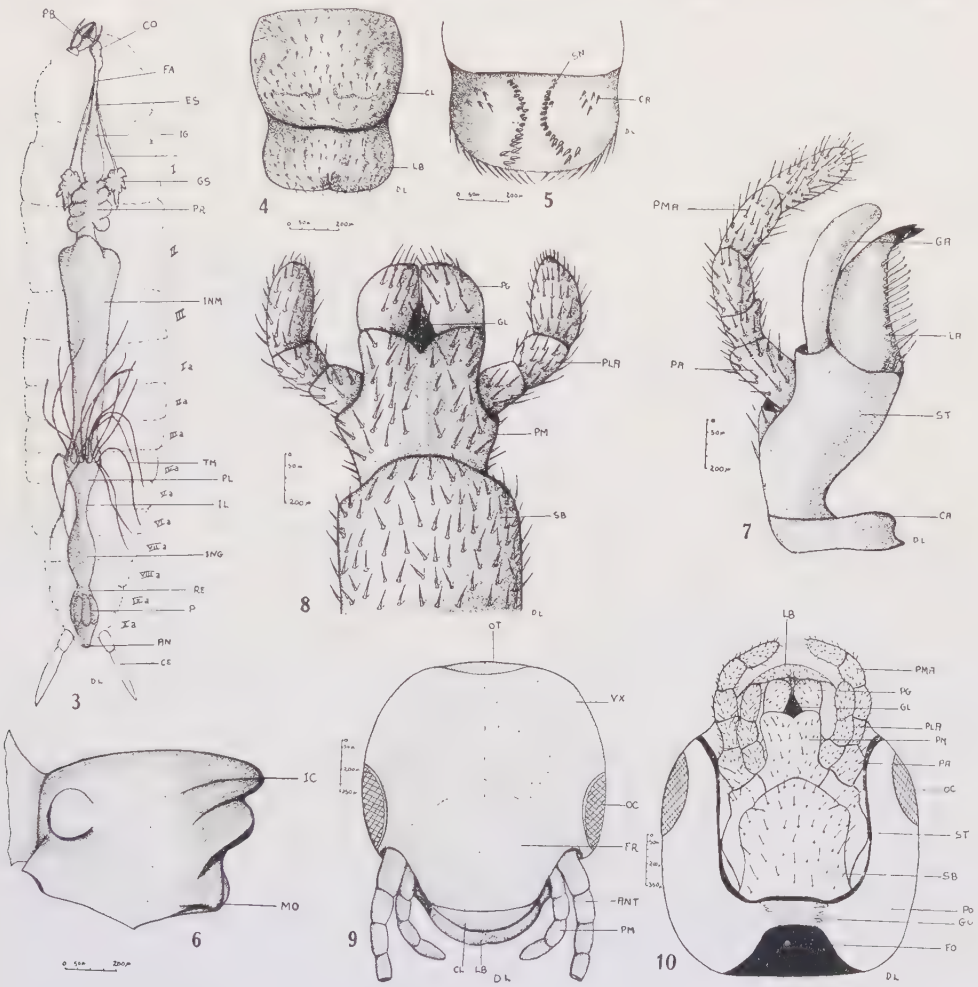


Fig. 3 — Localização do tubo digestivo no corpo; fig. 4 — labro, vista dorsal; fig. 5 — labro, vista ventral; fig. 6 — mandíbula; fig. 7 — maxila esquerda; fig. 8 — lábio, vista ventral; fig. 9 — cabeça com partes bucais, vista dorsal; fig. 10 — idem, vista ventral. (AN = ânus; ANT = antenas; CA = cardo; CE = cerco; CL = clípeo; CO = cavidade oral; CR = cerda; ES = esôfago; FA = faringe; FO = forame ocipital; FR = fronte; GA = gálea; GL = glossa; GS = glândula salivar; GU = gula; IC = incisivos; IG = inglúvia; IL = íleo; ING = intestino grosso; INM = intestino médio; LA = lacínia; LB = labro; MO = molares; OC = ôlho; OT = occiput; P = papilas; PA = palpífer; PB = partes bucais; PG = paraglossa; PL = piloro; PLA = palpo labial; PM = prémento; PMA = palpo maxilar; PO = partes das pósgenas; PR = proventrículo; RE = reto; SB = submento; SN = sensilas; ST = estipes; TM = tubo de Malpighi; VX = vertex).

ção do lábio é reter o alimento na cavidade bucal durante a trituração feita pelas mandíbulas e maxilas.

Cavidade bucal e sistema salivar

O tubo digestivo começa com a cavidade bucal, que representa uma curta dilatação na parte inicial da faringe. No assoalho da faringe forma-se uma dobra cônica que, devido a uma forte musculatura pode

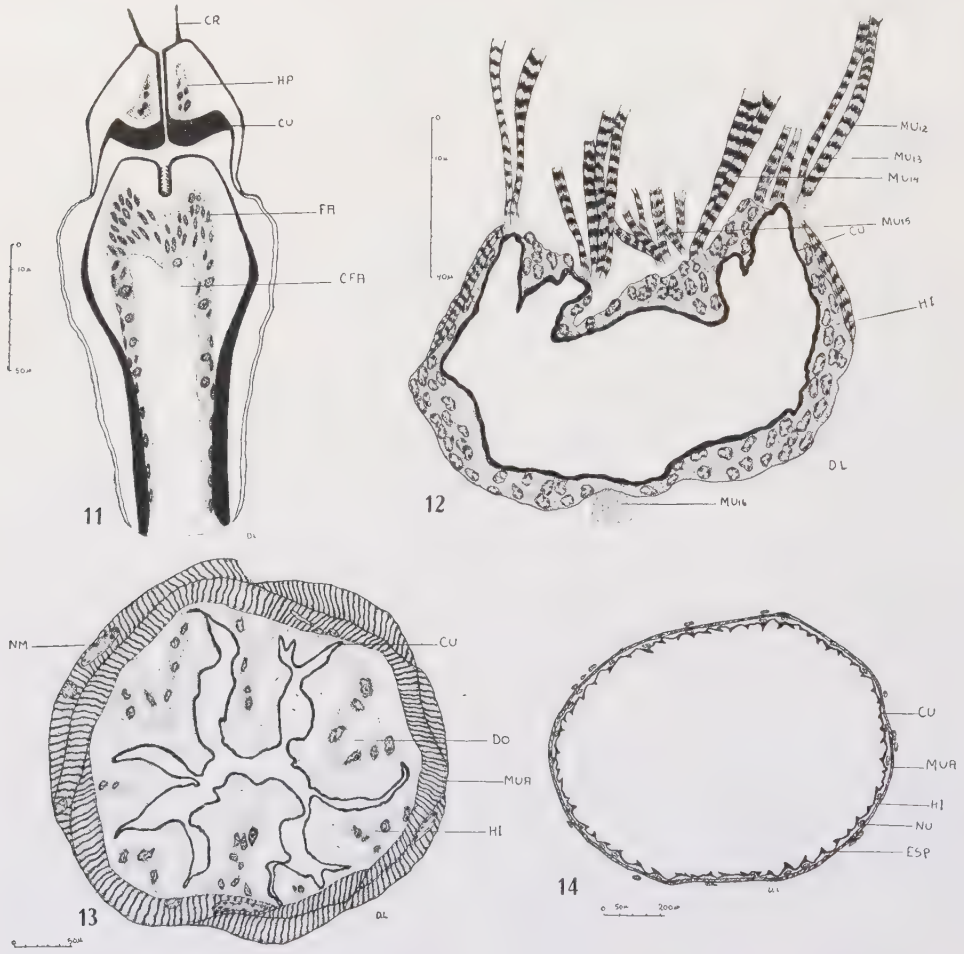


Fig. 11 — Fundo da cavidade bucal, com à hipofaringe; fig. 12 — corte transversal da faringe; fig. 13 — corte transversal da faringe, com dilatadores; fig. 14 — corte transversal do esôfago. (CFA = cavidade da faringe; CR = cerda; CU = cutícula; DO = dobra; ESP = espinhos; FA = faringe; HI = hipoderme; HP = hipofaringe, com canal salivar; MU12-15 = músculos dilatadores dorsais da faringe; MU16 = músculos dilatadores ventrais da faringe; MUA = musculatura circular; NM = núcleo do músculo; NU = núcleo).

se mover. Esta formação é chamada — hipofaringe — e possui um canal longitudinal no seu interior, que representa o canal excretor do sistema salivar. Um corte longitudinal frontal (fig. 11), feito pela hipofaringe, mostra que lateralmente à abertura salivar, há duas cerdas. O canal salivar, logo de início, divide-se em dois ramos, que correm

paralelamente e abaixo do tubo digestivo, indo ter às duas glândulas salivares (GS, fig. 3). Em outra oportunidade trataremos mais minuciosamente das glândulas salivares.

Faringe (figs. 12 e 13)

Estende-se da cavidade bucal até ao esôfago, onde terminam os músculos dilatadores da faringe (fig. 3, FA). A parede interna da faringe é revestida de cutícula, como tôdas as partes de origem ectodérmica. Sua luz é preenchida por diferentes dobras longitudinais, que em virtude de sua altura tomam quase tôda a cavidade faringeana (fig. 13, DO). As células da faringe são sinciciais, e se encontram abaixo da cutícula acompanhando as dobras. Revestindo externamente a faringe encontra-se uma forte camada de musculatura circular. A principal função da faringe é impulsionar os alimentos para o esôfago. Pela contração dos músculos dilatadores a cavidade da faringe é aumentada possibilitando a entrada do alimento e, pela contração da musculatura circular a sua luz é diminuída, de modo que a substância passa ao esôfago (fig. 12, MU 12 — 16).

Esôfago (fig. 14)

A terminação dos músculos dilatadores da faringe marca o início do esôfago, que vai se estender até ao proventrículo (fig. 3). É um tubo simples sem dobras e de calibre maior que o da faringe (fig. 14). O seu revestimento cuticular forma espinhos fortemente esclerosados e distribuídos igualmente em grande número, sôbre a sua parede interna. A hipoderme é também sincicial. Na sua porção posterior o esôfago dilata-se formando a inglúvia (fig. 3, IG). Tanto o esôfago como a inglúvia são envolvidos externamente por musculaturas longitudinal, transversal e circular sendo as mesmas em comparação com a da faringe, consideràvelmente mais fracas. O alimento após atravessar a faringe é transportado lentamente, de modo que não há necessidade de uma forte musculatura. O esôfago na sua porção terminal forma uma dobra que penetra no proventrículo. Neste lugar a musculatura circular é reforçada (fig. 15, MU2). A válvula esofagiana (fig. 15, VE) é formada por um estrangulamento da porção final do esôfago e uma invaginação da parte inicial do proventrículo. A válvula cardíaca (fig. 15, VC) marca o final do proventrículo e o início do intestino médio.

Proventrículo (fig. 15)

A parte interna do proventrículo é revestida por uma cutícula forte, e as células do hipoderma são mais altas que as do esôfago. Tôda a cutícula possui, assim como no esôfago, um reforçamento em forma de espinhos. Próximo a válvula cardíaca *a hipoderme* aumenta formando seis saliências bem fortes e cuticularizadas, que também se acham revestidas de pequenos espinhos (DT). Abaixo das células hipo-

dérmicas encontram-se fascículos de músculos circulares (MUI), relativamente fracos e pouco distanciados. Após, encontramos musculaturas

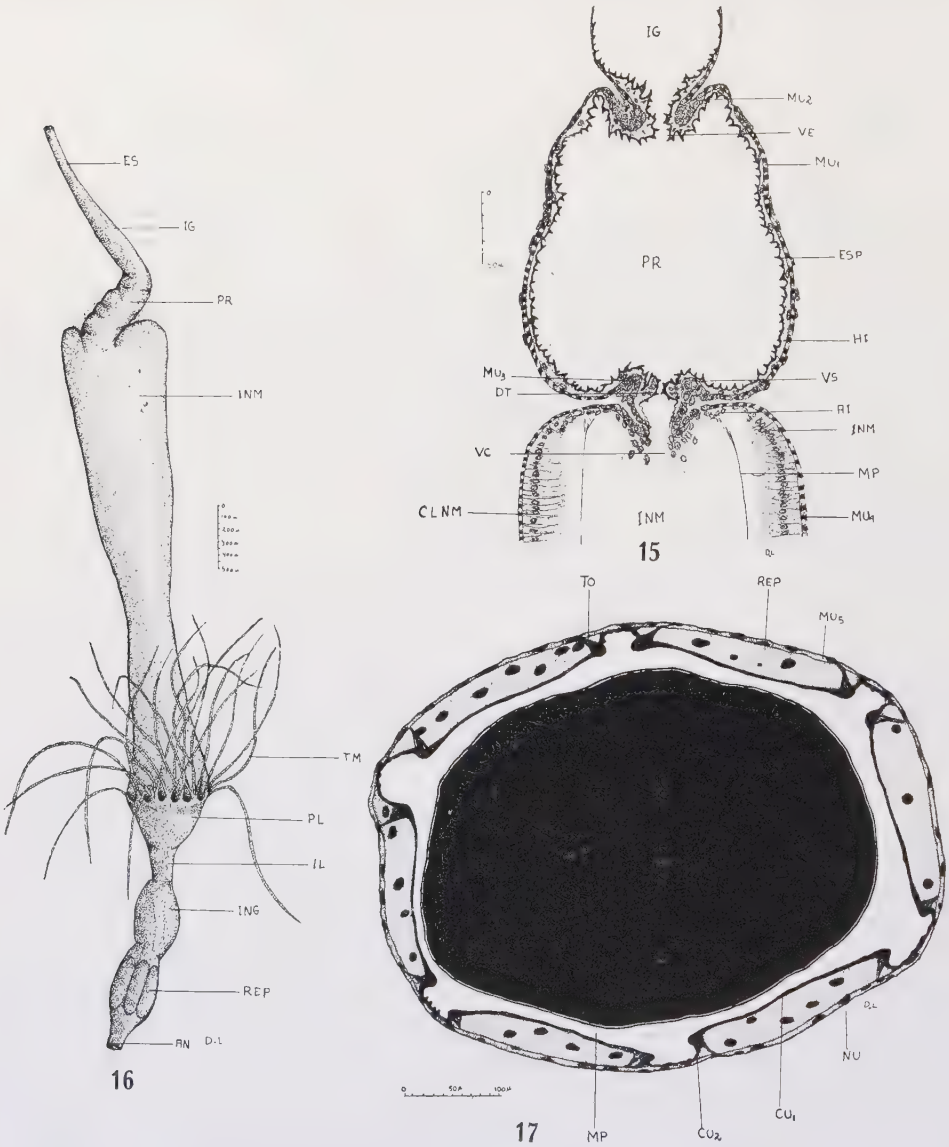


Fig. 15 — Corte longitudinal do proventrículo com inglúvia e parte inicial do intestino médio; fig. 16 — tubo digestivo; fig. 17 — corte transversal do reto, com papilas retais. (AI = anel imaginal; AN = ânus; CINM = células do êntero; CU1 = cutícula das papilas retais; CU2 = cutícula, aumentada, dos lados das papilas retais; DT = dentes do esôfago; ES = esôfago; ESP = espinhos; HI-= hipoderme; IG =inglúvia; IL = íleo; ING = intestino grosso; INM = intestino médio; MP = membrana peritrófica; MU1 = músculos longitudinais do proventículo; MU2 = musculatura circular da válvula esofagiana; MU3 = musculatura circular do esfincter do esôfago; MU4 = musculatura longitudinal do êntero; MU5 = musculatura circular do reto; NU = núcleo; PL = piloro; PR = proventrículo; REP = papilas retais; TM = tubo de Malpighi; TO = tonofibrila; VC = válvula cardíaca; VE = válvula esofagiana; VS = esfincter do proventrículo).

longitudinais fortes (MO3). O número de músculos circulares aumenta nos ângulos internos das duas válvulas, formando dois aneis musculares, fortes, que agem como um esfíncter. Os espinhos e dentes funcionam pela contração de tôda a musculatura, triturando o alimento. A mesma contração efetua o fechamento das duas válvulas. A válvula cardíaca, como a esofagiana, funciona como esfíncter, de maneira que após a entrada do alimento o proventrículo fica fechado. Por intermédio de sua forte musculatura ao contrair-se, os dentes e espinhos, rasgam e maceram o alimento aí contido. Sem essas válvulas a contração do proventrículo faria o alimento voltar ao esôfago ou seguir diretamente para o intestino, o que seria prejudicial ao inseto.

Partes do ênteron

O ênteron é representado (fig. 16) por um tubo alongado e reto, sendo a única porção do tubo digestivo, cujas células têm a função de secretar ou reabsorver substâncias, enquanto que as do estomodeu e as do proctodeu (com exceção das papilas retais) apenas possuem uma função condutora. A origem do ênteron é endodérmica, de maneira que o limite ectoderme e endoderme representa, simultâneamente, o começo e o fim do intestino. Sendo de origem endodérmica, sua parede interna não possui cutícula como as outras partes citadas (proctodeu e estomodeu). O intestino na sua porção inicial vai formar a válvula cardíaca. Um anel de células hipodermais do intestino penetra na sua luz, formando bolsas e originando a válvula cardíaca, que vai impedir automàticamente, sem ação muscular, um refluxo do alimento ao proventrículo. Se considerarmos a parte posterior do proventrículo e a inicial do ênteron temos a formação de uma válvula dupla. A primeira porção constituída pelo proventrículo (veja acima) funciona pela contração da musculatura anular, agindo como um esfíncter; e a segunda porção formada pelo intestino é a válvula cardíaca pròpriamente dita, composta de células indiferenciadas que provêm do anel imaginal. Logo, as células do anel imaginal representam, no adulto, o antigo ponto de crescimento do epitélio do ênteron e, no jovem, o começo do epitélio. A camada unicelular que provém do anel imaginal representa o epitélio do intestino. É constituído de células uniformes, altas e ativas (fig. 20, veja parte histológica).

A parte final do ênteron penetra no piloro formando aí muitas dobras, e originando a válvula pilórica.

Partes do proctodeu

Piloro (fig. 16, PL) — Podemos determinar o comêço do piloro, internamente, pela presença de cutícula e, externamente, por uma zona mais saliente onde vão se inserir os tubos de Malpighi (TM). O número de tubos de Malpighi varia sendo, em geral, de 25 a 30. Êles possuem uma inserção larga, que logo após diminui, constituindo canais do mesmo

calibre; cada tubo pode dividir-se em dois, três ou mais ramos de modo que, morfològicamente, encontramos grupos de tubos de Malpighi com uma só inserção.

Íleo ou Intestino delgado (fig. 16, IL) — É a região mais estreita, situada abaixo do piloro, e liga êste ao intestino grosso. É envolvido externamente por forte musculatura, que vai agir como um esfíncter, dando ou não passagem aos restos de alimento. Também aqui vamos ter a formação de dobras, que vão permitir, através da musculatura, um aumento ou diminuição da luz.

Intestino grosso (fig. 16, ING) — É uma porção mais dilatada situada em seguida ao íleo e, como êste, possui forte musculatura. O número de dobras diminui, acentuadamente, à medida que esta região se aproxima do reto.

Reto (fig. 16, REP) — É a última parte do tubo digestivo. Encontram-se aí seis papilas retais (fig. 17, REP), com seu eixo maior paralelo ao tubo digestivo. Estas papilas são de grande importância para o inseto, porque retiram a água do bolo fecal, e provàvelmente ainda substâncias nutritivas que não foram reabsorvidas pelo ênteron.

Durante a época da sêca a função das papilas retais torna-se mais ativa pois retiram do alimento a pouca quantidade de água que penetra com o mesmo, cedendo-a à cavidade do corpo e não deixando que o inseto sofra as conseqüências da sêca. Em um corte transversal esquemático (fig. 17) do reto podemos observar a disposição destas papilas retais. Revestindo internamente a cavidade do reto encontra-se uma cutícula que se espêssa fortemente nas extremidades laterais.

HISTOLOGIA DO TUBO DIGESTIVO

O ducto intestinal compreende: intestino anterior ou estomodeu; intestino mediano ou ênteron e intestino posterior ou proctodeu. A primeira porção e a última representam, do ponto de vista ontogenético, invaginações da ectoderme, possuindo por isto uma parede formada por todos os elementos que também existem na parede do corpo. A parte mediana, ao contrário, é formada pelo folheto endodérmico do embrião, apresentando inicialmente uma formação diferente.

Partes do estomodeu

Faringe (figs. 12 e 13) — Num corte transversal feito na faringe observa-se que as células da hipoderme (HI) são consideràvelmente altas. Seu citoplasma é pouco denso e sincicial, e o núcleo geralmente de forma achatada com pouca cromatina. A cutícula (CU) é lisa, sem formações em espinhos. A faringe apresenta-se com muitas dobras e sem reforçamentos, pois aqui, a forte musculatura anular é que efetua a contração da faringe durante a alimentação, ao contrário de outros

insetos, sem musculatura anular, onde a elasticidade e o bom reforçamento da parede da faringe ajudam no transporte do alimento. Nem mesmo os ângulos internos das dobras apresentam reforçamentos, o que vem indicar sua expansibilidade.

A hipoderme se acha separada da musculatura pela membrana basal que, nas figs. 12 e 13, não é visível; nota-se ainda nestas figuras que a musculatura está contraída. O tipo de musculatura estriada corresponde à apresentada na fig. 29, e descrita juntamente com o íleo.

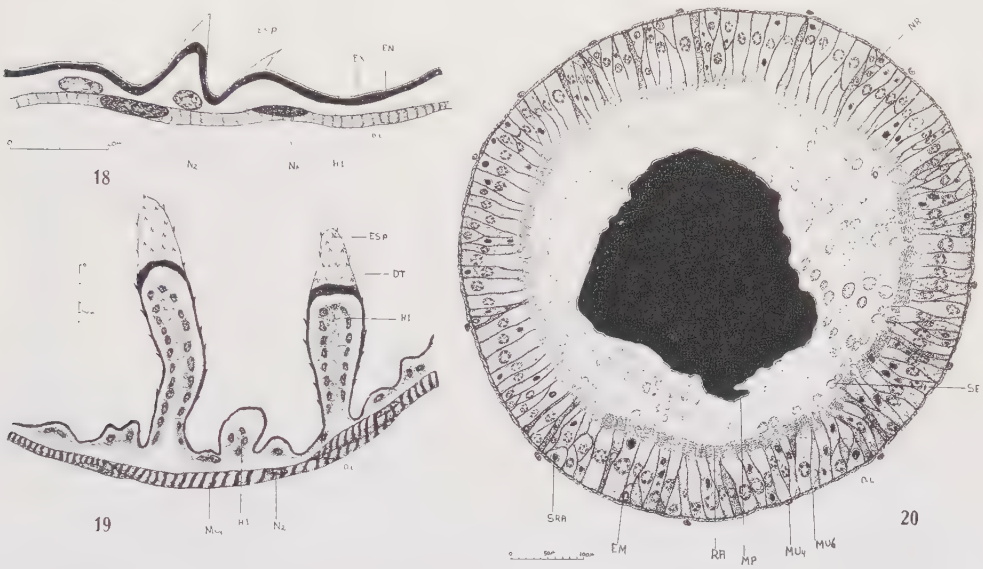


Fig. 18 — Corte parcial da parede do esôfago; fig. 19 — dois espinhos do proventrículo em corte longitudinal; fig. 20 — corte transversal do ênteron. (DT = dentes do esôfago; EM = epitélio do ênteron; EN = endocutícula; ESP = espinhos; EX = exocutícula; HI = hipoderme; MP = membrana peritrófica; MU1 = músculos longitudinais do proventrículo; MU4 = musculatura longitudinal do ênteron; MU6 = musculatura circular do ênteron; N1 = núcleo da hipoderme; N2 = núcleo do músculo; NR = nicho de células de regeneração; RA = rabdômero; SE = secreção; SRA = material de reabsorção).

Esôfago (fig. 18) — As células da hipoderme são também sinciciais, porém a espessura da camada celular é bem menor que a da faringe, e aqui também o citoplasma é pouco denso e não homogêneo. A cutícula vai se diferenciar nìtidamente em exocutícula (Ex) e endocutícula (EN). A exocutícula forma (fig. 18) verdadeiros dentes, fortes e ponteagudos, em tôdas as direções (ESP). A endocutícula não acompanha a exocutícula na formação dos dentes. A estrutura lamelar da exocutícula quase não é visível, enquanto a da endocutícula é bem nítida. A musculatura do esôfago é mais fina que a da faringe. De forma cilíndrica, possui feixes musculares longitudinais isolados, situados entre a membrana basal da hipoderme e a musculatura anular, o que não se encontra na faringe. Êsses músculos longitudinais aumentam na extremidade da região esofagiana, próximo do limite inglúvia e proventrículo.

Proventrículo (fig. 19) — A formação da parede do proventrículo é a mesma que a do esôfago porém nota-se um aumento da musculatura longitudinal e diminuição da anular. A origem dos dentes (DT) aqui encontrados é a mesma que a do esôfago. É interessante notar a função dos seis espinhos que circundam a entrada do ênteron; êles representam invaginações da parede do proventrículo e têm cutícula bem reforçada, penetrando profundamente na luz do proventrículo. Êstes espinhos são recobertos por dentes cuticulares. A hipoderme dêstes espinhos tem as células bem diferenciadas o que não se observa na hipoderme das outras partes do proventrículo, onde ela é sincicial (fig. 19, HI). A individualização destas células hipodermais na formação dos espinhos demonstra, talvez, uma formação de cutícula contínua e, em outras partes, que já tendo finalizado esta função, com a última muda do inseto elas se tornam sinciciais. O alimento ao ser triturado naturalmente as extremidades dos espinhos se gastam na trituração dos alimentos, sendo então renovados pelas células da hipoderme que formam uma nova porção de cutícula, tal como acontece com as presas dos elefantes e os dentes dos roedores.

Partes do ênteron

Fazendo-se um corte transversal do intestino vemos que seu epitélio é formado por células prismáticas e altas que se acham, simultaneamente, em tôdas as fases de secreção. A função destas células é dupla: por um lado é glandular, produzindo secreções que desdobram o alimento, secreções que saem das células intestinais em forma de bolhas, atravessam a parte externa da luz do intestino e a membrana peritrófica entrando após na luz central onde se encontra o alimento; e de outro, as mesmas reabsorvem as substâncias já então liquefeitas. A produção de secreção é um processo contínuo mas separavel em cinco fases diversas, que podemos chamar de típicas:

Primeira fase (fig. 21) — Em repouso as células epiteliais são estreitas e altas medindo, em média, 100 μ de altura e 8 μ de diâmetro. O citoplasma é denso e transformado parcialmente em fios longitudinais que incluem entre sí protoplasma não diferenciado, no qual se encontram granulações relativamente grandes que se acolam aos filamentos e que, provàvelmente, correspondem ao material formador da pré-secreção. Nota-se que há maior acúmulo de pré-secreção na parte basal do que na parte epical da célula. No ápice da célula esta rêde de filamento é menos densa deixando espaços entre sí para formação de pequenos vacúolos. O núcleo é oval (14 μ x 7 μ) tendo seu maior diâmetro paralelo ao eixo longitudinal da célula. Sua largura é pouco menor que a da célula; sempre apresenta um nucléolo bem visível e tem pouca cromatina que se dispõe em maior quantidade na sua periferia. A extremidade apical da célula é formada por um bordo limiar muito alto — o rabdório. Êste é composto por fios plasmáticos muito finos que cobrem o ápice de cada célula, e, conseqüentemente, o intestino inteiro, formando como que um feltro.

Segunda fase (fig. 22) — A celula aumenta consideràvelmente o seu diâmetro, também a base alarga-se algumas vêzes distendendo a membrana peritoneal e a *muscularis*. O citoplasma é mais frouxo, de modo que os filamentos tornam-se mais visíveis e aparece, no polo basal, uma zona estriada que pode ser chamada de zona do ergastoplasma (EG). Na parte apical do núcleo, os filamentos divergem fortemente formando grandes fendas e vacúolos que, aparentemente, são vazios mas, provàvelmente, contém secreções que, pela fixação e desidratação, em sua

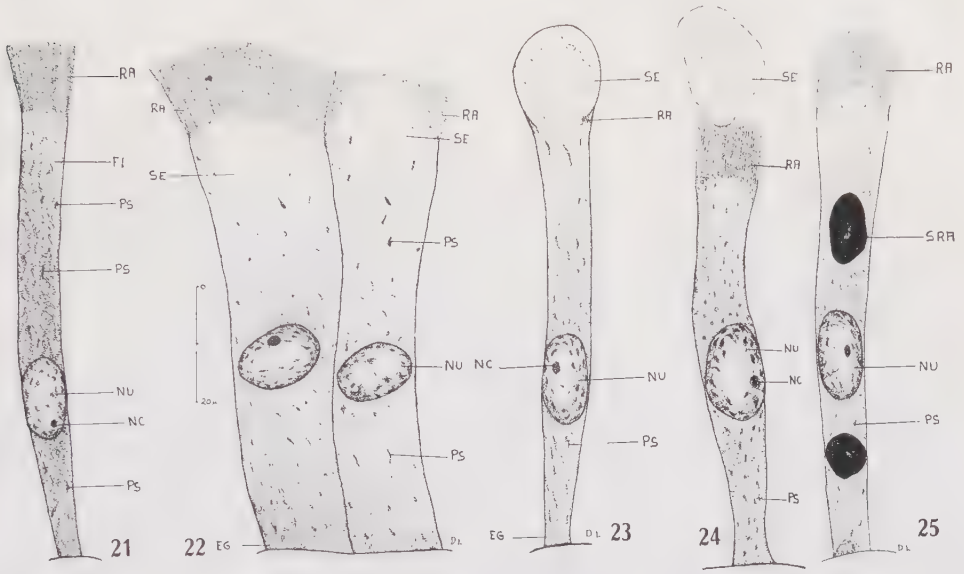


Fig. 21 — Célula do ênteron, em repouso; fig. 22 — idem, durante o preparo da secreção e com grande vacúolo apical de secreção; fig. 23 — idem, com a expulsão da secreção; fig. 24 — idem, terminando a mencionada expulsão; fig. 25 — idem, com substância reabsorvida. (Tôdas as figuras na mesma escala). (EG = ergastoplasma; FI = filamento do citoplasma; NC = nucléolo; NU = núcleo; PS = grânulos de pré-secreção; RA = rabdômero; SE = secreção; SRA = material de reabsorção).

maioria são dissolvidas, apenas uma pequena parte se tornando visível depois do tratamento pelo ácido ósmico, aparecendo sob a forma de um véu fino de granulações no grande espaço de secreções, na parte apical da célula. Na base do núcleo encontram-se ainda numerosos grânulos de pré-secreção e, no lado apical do mesmo, êste número diminui. O núcleo não apresenta quaisquer modificações típicas. Interessante é o comportamento do rabdório (RA): enquanto que o bordo apical é quase três vêzes mais largo que no estado de repouso e a área apical é aumentada nove vêzes, a densidade dos fios do rabdório diminui muito, ao passo que o número dos mesmos sofre grande aumento.

Terceira fase (fig. 22) — A secreção (SE) acumula-se no polo apical da célula formando uma grande esfera que desloca cada vez mais o rabdório. Não foi possível observar se êste processo se faz mecanicamente ou se os fios do rabdório são dissolvidos. A parte restante do cor-

po da célula não sofre modificações notáveis. O núcleo, durante o início da expulsão da secreção, diminui visìvelmente de tamanho, fato êste que é um processo típico para as células glândulares.

Quarta fase (fig. 23) — A secreção sai da célula sob a forma de uma grande esfera e, do rabdório nota-se apenas um resto nos bordos celulares laterais. O diâmetro da célula volta a ser o mesmo que quando em repouso. A rêde protoplasmática se adensa e o número de granulações da pré-secreção, acima do núcleo, aumenta novamente. O núcleo, que nas fases precedentes em geral se encontra em posição transversal na célula, orienta-se mais uma vez em sentido longitudinal e a sua cromatina começa a concentrar-se mais e mais.

Quinta fase (fig. 24) — A restauração da célula completa-se ràpidamente e o rabdório regenera completamente. O protoplasma é denso e repleto de novas granulações especialmente na base da célula onde há uma forte condensação. A bolha de secreção solta-se da célula e penetra agora no espaço formado entre o epitélio e a membrana peritrófica. É limitada por uma película fina que logo se rompe, de modo que a secreção se escoa e pode atravessar a membrana peritrófica. Há dúvida quanto à origem desta membrana protetora da secreção, podendo ser constituída por uma fina camada protoplasmática do material da própria célula ou então, de partes do rabdório eliminados durante a formação da secreção. Esta secreção se torna visível dentro da esfera, sob a forma de um delicado véu de grânulos visível após um tratamento pelo ácido ósmico. Êste tipo de secreção recebe o nome de apomerócrina.

Fase de reabsorção (fig. 25) — Nas células da quinta fase encontram-se muitas vêzes um ou mais vacúolos cujo conteúdo se torna negro pelo tratamento com ácido ósmico. São substâncias reabsorvidas (SRA) pois possuem sempre o mesmo diâmetro, tanto dentro do rabdório como na parte apical e basal da célula; se fossem grânulos de secreção deveriam aumentar de volume subseqüentemente, a medida que se dirigissem do polo basal para o polo apical. Através da fixação pode-se concluir sôbre a natureza do material, gorduroso ou oleoso.

O tipo apomerócrino de secreção consome pouco material protoplasmático, porém há numerosos casos semelhantes em que, quando o processo secretorial é muito ativo, as células são substituídas de vez em quando. Por todo ênteron encontram-se nichos de regeneração, formados pela acumulação de células ainda não diferenciadas mas, que (fig. 20, NR) em caso de necessidade, transformam-se em células secretoras substituindo as gastas. No seu interior o ênteron possui a membrana peritrófica (fig. 20, MP) que inclui o alimento ingerido. Serve para proteger as células epiteliais que aqui são isentas de muco, o que já não acontece com, por exemplo, as células dos mamíferos. A membrana se origina das células do anel imaginal, e não possui uma estrutura celular. Não pode ser dito, com muita certeza, se a membrana representa um derivado protoplasmático das citadas células ou se apenas é uma secreção das mesmas.

Em direção ao ânus o epitélio do intestino começa a formar dobras que no fim do ênteron aumentam muito, penetrando na cavidade do piloro, formando a válvula pilórica. Um corte transversal da parte inicial da válvula está representado na fig. 26. Na parte esquerda do corte podem-se notar as camadas de musculatura do ênteron formada por músculos transversais, diagonais e longitudinais, relativamente fracos. No centro do corte aparece (em prêto) parte da cavidade do ênteron que é limitada pela membrana peritrófica. O espaço entre esta membrana e o epitélio (em branco) é estreito. O epitélio aparece alto pois foi cortado através das dobras. À direita, no corte, encontra-se a cavidade do piloro (em branco) com a sua hipoderme, que é limitada pela membrana basal e pela musculatura. O sentido do corte é um pouco diagonal.

Partes do proctodeu

Piloro (figs. 26 e 27) — Correspondendo à sua origem, de invaginação ectodérmica do proctodeu embrionário, a superfície interna do piloro é revestida por uma fina cutícula. Assim as células são homólogas às da hipoderme da parede do corpo. Possuem um protoplasma mais ou menos homogêneo deixando ver apenas poucos filamentos longitudinais e uma condensação fraca nas partes apicais. Os núcleos são pequenos, quase circulares e, encontram-se sempre no centro da célula (figs. 26 e 27). A membrana basal das células do piloro é notàvelmente grossa possuindo estrutura celular (veja-se os núcleos NMPL na fig. 27). Na zona de passagem do ênteron para o piloro inserem-se os tubos de Malpighi. A estrutura histológica dos tubos será apresentada posteriormente. É interessante notarmos a membrana protetora (membrana basal ou celomática?) dos tubos (MTM), que se diferencia, nìtidamente, da membrana basal das células hipodérmicas do piloro (MPL). Os núcleos desta última são menores e possuem menos cromatina, enquanto que os dos tubos são maiores e têm mais cromatina, conseqüentemente, coram-se mais intensamente. Em cortes favoráveis foi possível observar, nìtidamente, uma linha que separa as duas membranas (fig. 27, A). O protoplasma das duas membranas é orientado em lamelas.

Íleo (*Intestino delgado*) (fig. 28) — Enquanto o piloro possui uma parede lisa o íleo forma um número variável de dobras longitudinais. Observa-se que a forte membrana basal não entra nas dobras mas se mantém numa circunferência mais ou menos regular. Tomando-se em consideração a espêssa musculatura circular conclui-se que o íleo possui uma grande expansibilidade. As células são uniformes, quase cúbicas, apresentando uma ligeira condensação protoplasmática no polo apical. O núcleo, com localização central, possui pouca cromatina acolada à sua parede. A cutícula é pouco mais forte do que a do piloro.

A musculatura circular é composta de grandes e fortes feixes de fibrilas. O sarcoplasma é reduzido e encontra-se sòmente na periferia onde vão localizar-se também os grandes núcleos achatados. O canal sarcoplasmático central está ausente. O tipo de estriação é apresentado na fig. 29. As inocomatas são muito grandes e limitadas por miofragma (Z) forte.

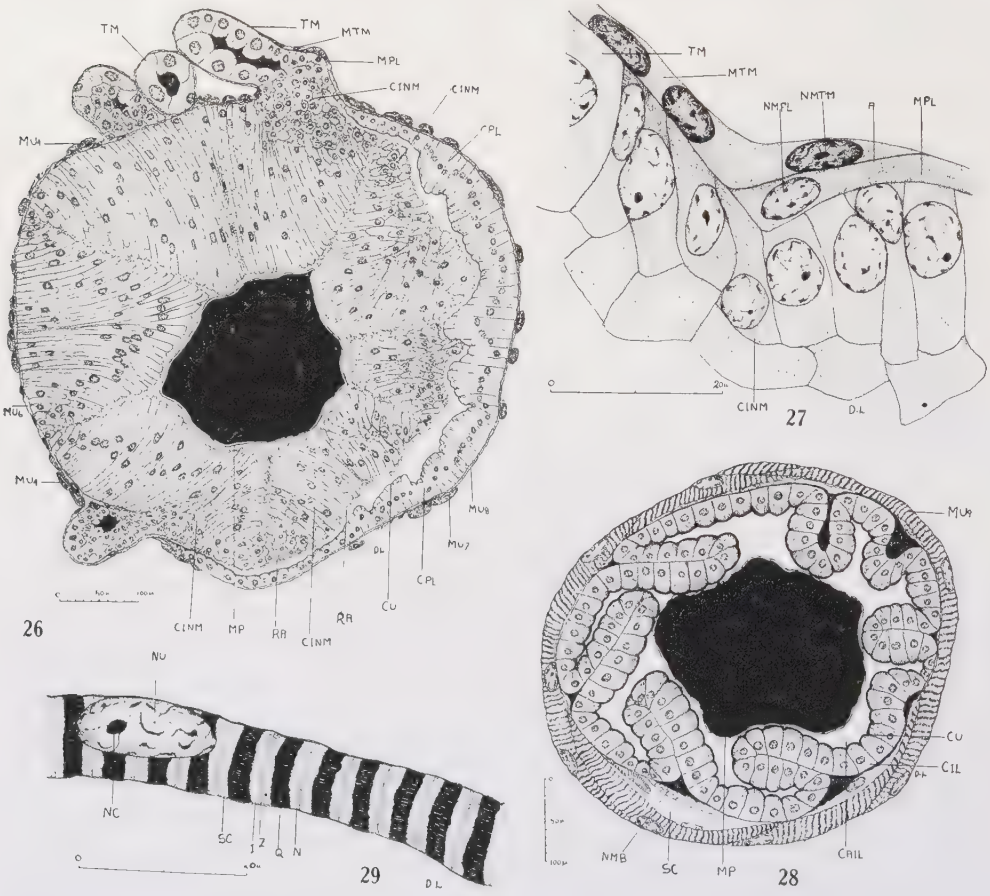


Fig. 26 — Corte transversal da parte terminal do ênteron e comêço do piloro, com inserção dos tubos de Malpighi; fig. 27 — inserção de um tubo de Malpighi; fig. 28 — corte transversal do íleo, com dobras; fig. 29 — feixe muscular da musculatura circular do íleo. (CAIL = cavidade do íleo; CIL = células do íleo; CINM = células do ênteron; CPL = células do piloro; CU = cuticula; MP = membrana peritrófica; MPL = membrana basal do piloro; MTM = membrana do tubo de Malpighi; MU4 = musculatura longitudinal do ênteron; MU6 = musculatura circular do ênteron; MU7 = musculatura longitudinal do piloro; NC = nucléolo; MU8 = musculatura circular do piloro; MU9 = musculatura circular do íleo; NMB = membrana basal; NMPL = núcleo da membrana do piloro; NMTM = núcleo da membrana do tubo de Malpighi; NU = núcleo; RA = rabdômero; SC = sarcoplasma; TM = tubo de Malpighi).

Perto de Z, na parte isotrópica, encontram-se os "Neben-scheiben" (N) formados por grânulos bem visíveis (fixação pelo ácido ósmico). A cavidade do íleo é atravessada ainda pela membrana peritrófica que vai ser destruída na cavidade retal.

Colon (Intestino grosso) — O colon é uma curta parte do tubo digestivo que se segue ao íleo, possuindo também dobras longitudinais, mas em número reduzido. As células apresentam a mesma estrutura que as do íleo. A musculatura circular é mais fraca.

Reto (figs. 30 a 33) — A parede do reto é caracterizada por seis grandes papilas retais formadas por enormes células hipodermais. Estas

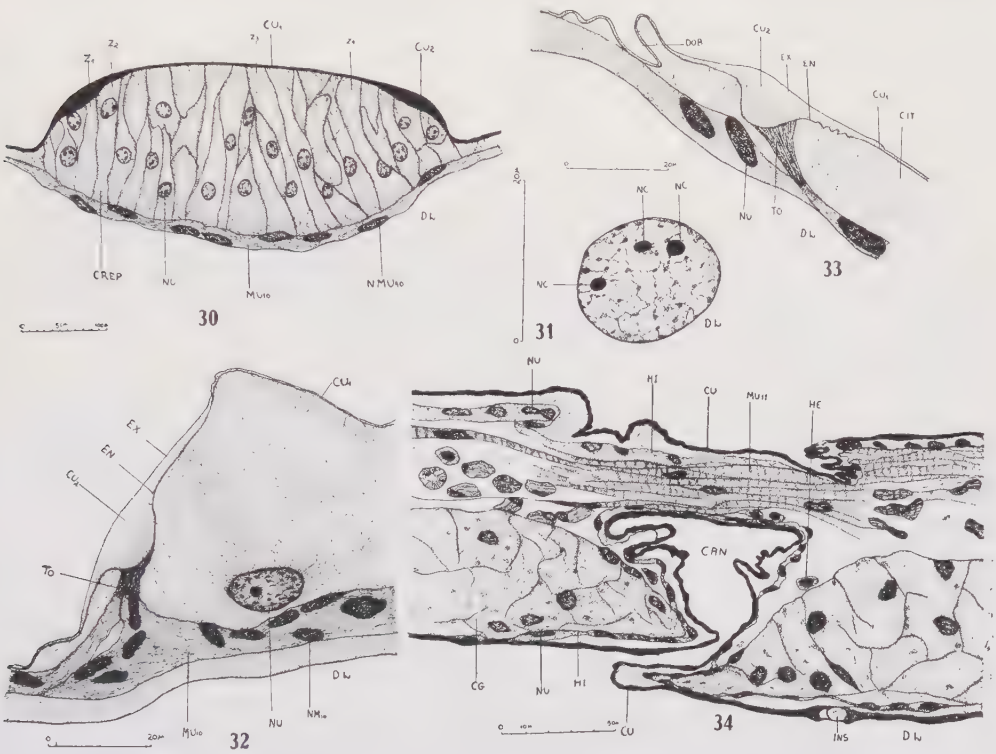


Fig. 30 — Corte transversal de papila retal; fig. 31 — núcleo de papila retal com 3 nucléolos, em corte aproximadamente equatorial; fig. 32 — parte lateral de papila retal cheia; fig. 33 — idem, de papila vasia; fig. 34 — corte longitudinal do músculo do esfíncter do ânus. (CAN = cavidade do ânus; CG = corpo gorduroso; CIT = citoplasma das papilas retais; CREP = células das papilas retais; CU = cutícula; CU1 = cutícula das papilas retais; CU2 = cutícula, aumentada, dos lados das papilas retais; EN = endocutícula; EX = exocutícula; HE = hemátia; HI =hipoderme; INS =inserção; MU10 = musculatura circular do reto; MU11 = esfíncter do ânus; NC = nucléolo; NMU10 = núcleo dos músculos circulares do reto; NU = núcleo; TO = tonofibrila).

são compostas de uma camada unicelular de células altas, prismáticas que se encostam numa membrana basal muito fina. As células, não sendo sempre localizadas paralelamente, aparecem no corte (fig. 30) apenas parcialmente, entretanto encontram-se algumas cortadas completamente em sentido longitudinal (Z 1-4 na fig. 30).

O protoplasma das células formadoras das papilas é nìtidamente filamentoso e tem uma condensação acentuada nos dois polos da célula.

Muitas vêzes encontram-se granulações que representam talvez, um acúmulo de substâncias tóxicas transportadas com a água do conteúdo do reto para as células e aí eliminadas, evitando assim a entrada de matéria nociva no corpo. Tôdas as células são uninucleadas. O núcleo é relativamente volumoso (fig. 31) e redondo; a sua posição dentro da célula varia muito. A membrana nuclear é muito forte. A fig. 31 mostra um núcleo fixado pelo ácido ósmico com três nucléolos, porém, o número dêstes pode variar. A cromatina acha-se em forma de pequenos grânulos acolados à rede de linina que é fortemente ramificada.

A área apical das papilas é recoberta pela cutícula, que se divide em exocuticula e endocutícula. Nos dois bordos laterais das papilas a cutícula aumenta (mais a endo que a exocutícula) em forma de listras. Nestes aumentos inserem-se tonofibrilas, (fig. 32, TO) que sob a forma de tendões entram em contacto com os feixes da forte musculatura anular (figs. 32 e 33). Ao exercer sua função, que é a de retirar água e substâncias tóxicas do bolo fecal, e talvez a de eliminar também substâncias alimentícias residuais, as papilas retais aumentam de altura. A cutícula que a reveste efetua numa medida crescente uma certa pressão e que ainda é aumentada pela contração muscular. Pode-se supôr que assim seja apressada a expulsão de água em direção à cavidade do corpo (fig. 33).

Região anal (fig. 34). — Enquanto a hipoderme até agora se compunha de células bem individualizadas, na região do esfíncter anal se torna sincicial. A fig. 34 mostra a forte musculatura circular de mesma estrutura que a do íleo.

RESUMO

É descrito anatômica e histològicamente o ducto digestivo do Embiídeo *Embolyntha batesi*. Consta de:

Cavidade bucal com as partes bucais e hipofaringe; faringe com musculatura circular e 5 pares de dilatadores; esôfago com a inglúvia que é pouco acentuada; proventrículo com válvulas funcionando como esfincter controlando a entrada e saída dos alimentos. Essas expansões cuticulares entram em contacto com a válvula cardíaca; ênteron (intestino mediano) começando no mesotórax e estendendo-se até o quinto segmento abdominal; piloro com 25 tubos de Malpighí em grupos de 2 a 5; íleo (intestino delgado) dilatável com numerosas dobras longitudinais e forte musculatura; colon (intestino grosso) também dilatável, constituindo a parte que liga o íleo ao reto; reto com seis papilas retais e cujas paredes possuem listras longitudinais cuticulares ligadas por tonofibrilas à musculatura circular, talvez podendo ser esvaziada pela contração circular e ânus com forte musculatura formando um esfíncter. As glândulas salivares formam um par de sacos com lóbulos, no protórax.

São descritas cinco fases secretoriais e um estado de reabsorção. É provável que êste siga ao último estado de secreção.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird der Darmtraktus der Embiiden *Embolyntha batesi* anatomisch und zytologisch beschrieben. Er besteht aus:

Mundhoehle mit den sie umgebenden Mundwerkzeugen und Hypopharynx;

Pharynx mit Ringmuskeln und fuenf Paaren von Dillatatoren;

Oesophagus mit Kropf, der nur wenig akzentuiert ist;

Proventrikel mit sphinkterartigen Ein-und Auslassventilen, das letztere (mit sechs zahnartigen Verstaerkungen) geht in die *Valvula cardiaca* ueber;

Mitteldarm, der bereits im Mesothorax beginnt und nur bis zum fuenften Abdominal segment reicht;

Pylorus mit 25 bis 30 Malpighischen Gefaessen, die in Gruppen von 2 bis 5 zusammen gefasst sind;

Ileum, ausdehnungsfaehig, mit zahlreichen Falten und kraeftiger Muskulatur;

Colon, ein ebenfalls ausdehnungsfaehiges Verbindungsstueck zum Rektum mit sechs Rektalpapillen, deren Waende cuticulare Laengsleisten besitzen, die durch Tonofibrillen mit der Ringmuskulatur verbunden sind und evtl. durch aktive Muskeltaetigkeit entleert werden;

Anus mit starker sphinkterartiger Muskulatur.

Die Speicheldruesen bilden ein paar glatter Saecke im Prothorax.

Es werden fuenf Stadien des Sekretvorgangs und ein Stadium der Resorbtion unterschieden. Es wird angenommen, dass das Resorbtionsstadium dem letzten Sekretionsstadium folgt.

BIBLIOGRAFIA

Barth, R., 1954, Untersuchungen an den Tarsaldruesen von *Embolyntha batesi* Mac Lachlan, 1877 (Embioidea). *Zool. Jb.*, (Anat.).

Denis, R., 1949, Ordre des Embioptères. In Grassé, P., *Traité de Zoologie*, vol. 9, Masson & Cie., Paris (*cf.* pp. 723-744, figs. 366-380).

Enderlein, G., 1903, Ueber die Morphologie, Gruppierung und systematische Stellung der Corrodentien. *Zool. Anz.*, 26: 423-438, 4 Fig.

Grassi, B. & Sandias, A., 1897/98, The constitution and development of the society of Termites: Observations on their habits; with appendices on the parasitic Protozoa of Termitidae, and on the Embiidae. *Quart. J. Microsc. Sci.*, 39: 245-322, pls. 16-20; 40: 55-75.

Hagen, H., 1885, Monograph of the Embidina. *Canad. Ent.*, 17: 141-155; 171-178; 190-199; 206-299.

Kraus, H.A., 1911, Monographie der Embien. *Zoologica*, 23 (60): 1-78

Kusnezov, N.J., 1906, Observations on *Embia taurica* Kusn. (1903) from the Southern Coast of the Crimea. *Horae Soc. Ent. Rossic.*, 37: 138-173 (em russo, sum. inglês) [1904-1905].

Melander, A.L., 1902, Two new Embiidae. *Biol. Bull.*, 3: 16-26, 4 figs.

Rimsky-Korsakow, M., 1905, Beitraeg zur Kenntnis der Embiiden. *Zool. Anz.*, 29: 433-442, 6 Fig.

Rimsky-Korsakow, M., 1910, Ueber das Spinnen der Embiiden. *Zool. Anz.*, 36: 153-156, 2 Fig.

Rimsky-Korsakow, M., 1914, Ueber den Bau und die Entwicklung des Spinnapparates bei Embien. *Z. wiss. Zool.*, 108: 499-519. 1 Fig. Taf. 17-18.

Saussure, H., Note sur la tribu des Embiens. *Mitt. Schweis. Ent. Ges.*, 9:

Verhoeff, K.W., 1904, Zur vergleichenden Morphologie und Systematik der Embiiden. *Nova Acta Acad. Leop. Carol.*, 82: 145-204, Taf. 4-7.

Observations on the morphology of *Australorbis glabratus*

W. Lobato Paraense and **Newton Deslandes**
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D.F.
Serviço Especial de Saúde Pública, Rio de Janeiro, D.F.

(With 9 text-figures and 4 plates)

The observations here presented are intended to contribute to the systematics of *Australorbis glabratus*. It is well known that snails exhibit a great amount of morphological variation, depending on both genetic and environmental factors. In this paper we study a sample of *A. glabratus* from a single breeding place, collected on the same occasion, and having the same shell diameter. So we aimed, as far as possible, to equalize the controllable causes of variation, related to limnic environment, climateric conditions, reproductive activity and stage of somatic development.

MATERIALS AND METHODS

We examined 50 specimens from irrigation ditches in the grounds of the Instituto João Pinheiro (Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brasil), collected on September, 1954. That breeding place was mentioned by Lutz (1934) as being inhabited by his species *Planorbis centimetralis* exclusively. On the basis of a biometric study, Paraense & Malheiros Santos (1950) demonstrated the inexistence of such species in that place. The genitalia of the planorbid snails existing there showed the characteristics described by Pilsbry (1934), Scott (1940), Baker (1945), and Bustorff Pinto & Deslandes (1953) as belonging to *A. glabratus*.

Specimens with 18 mm in shell diameter, commonly found in this species, were selected, a small variation of more or less 0.4 mm being examined.

Dissections were made according to the techniques described by Deslandes (1951).

This work was done through co-operation between the Instituto Oswaldo Cruz and the Serviço Especial de Saúde Pública, Brazil.

Serial histological sections (10μ) from three whole specimens fixed in Bouin's fluid, embedded in paraffin and stained with hematoxylin-eosin, were also examined. The diameters of these specimens were 18, 10 and 5 mm respectively, the two latter belonging to the F1 generation of the former.

SHELL

The freshly emptied shell was horny, translucent, covered with a slender epidermis, varying in colour (amber, blackish, dark olivaceous, ferruginous), with a fine oblique striation corresponding to the growth lines and showed 5 to 6 whorls. Right side slightly depressed but deeply umbilicated in the region of the central whorls. Left side broadly depressed. The last whorl, relatively high, extended over the preceding one up to the middle of the left surface of the latter. The heights of the last and penultimate whorls, taken between the sutures in the region of the shell aperture, were 5.96 ± 0.28 and 2.06 ± 0.16 mm respectively. The height ratio was 3: 1 in 40 cases in which the heights were 6 and 2 mm, varying from 2.4 to 2.7 : 1 in the 10 remaining cases. The aperture was either perpendicular or a little oblique to the right, sometimes to the left. The right wall of the aperture tended to be flat, the left one was more or less strongly convex. The aperture was 5.59 ± 0.24 mm wide (this measure corresponds to the greatest shell thickness) and 4.96 ± 0.26 mm high (internally).

The conformation of the shells exhibited a rather small variation both in our sample and in a great number of other specimens from the same breeding place. The shells closely resemble that illustrating Lutz's paper (1918) under the name *Planorbis guadaloupensis*. As stated by Pilsbry (1934, see discussion pp. 43-44), this name is synonymous with *A. glabratus*.

Some aspects of the shells are shown in pl. 1, figs. 1, 2 and 3.

ANIMAL

The head and foot are dark olivaceous. When the animal is removed from the shell, the mantle exhibits an olivaceous ground colour with black spots converging to the dorsal wall of the mantle cavity, so that the latter presents a black velvety aspect. The region of the mantle collar is olivaceous and externally shows a narrow yellow stripe just behind, and parallel to, the free margin of the mantle.

The uncoiled animal was 47.06 ± 3.31 mm long. We divided the body into a cephalic and a caudal portion, limited from each another by the stomach. The cephalic portion, 26.56 ± 2.65 mm long, is strongly muscular, containing the columella muscle which is inserted into the shell at the level of the stomach. The caudal portion, having no voluntary muscles, was 20.50 ± 2.24 mm. The lengths of the cephalic and caudal portions showed equivalent coefficients of variation (9.97 and 10.92%, respectively), thus indicating that killing by immersion into water at 70°C affords a satisfactory muscular relaxation.

RENAL TUBE

The waste products eliminated in the kidney (organ of Bojanus) are carried away by the renal tube.

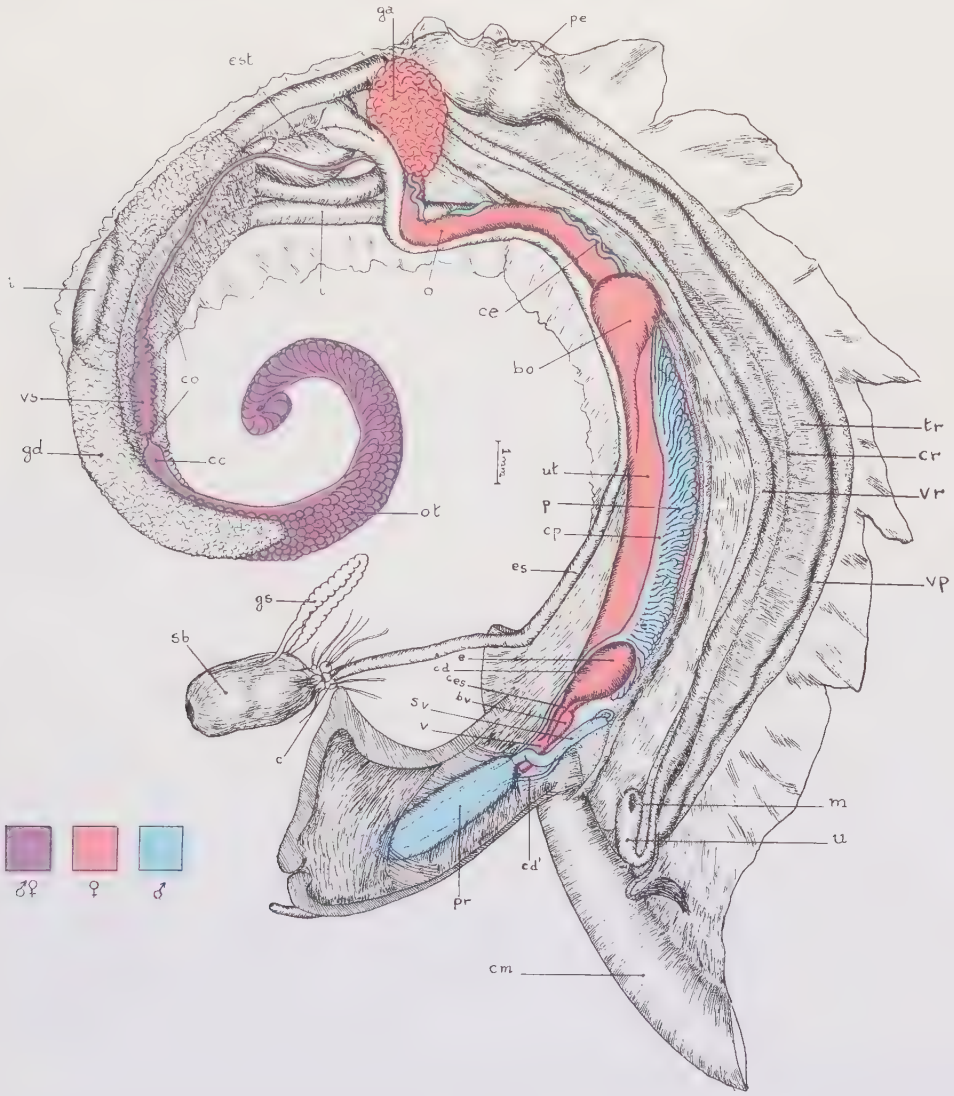


Fig. 1 — Right lateral view of the organs of *A. glabratus* with mantle and buccal sac dissected (bo = pouch of the oviduct; bv = vaginal pouch c = brain (periesophageal ganglia); cc = collecting canal of ovotestis; cd = proximal segment of vas deferens; cd' = distal segment of vas deferens; ce = sperm duct; ces = spermathecal duct; cm = mantle collar; co = ovisperm duct; cp = prostate duct; cr = renal ridge; e = spermatheca; es = esophagus; est =stomach; ga = albumen gland; gd = digestive gland; gs = salivary gland; i = intestine; m = meatus of ureter; o = oviduct; ot = ovotestis; p = prostate; pe = pericardium, around heart; pr = preputium; sb = buccal sac; sv = vergic sac; tr = renal tube; u = ureter; ut = uterus; v = vagina; vp = pulmonary vein; vr = renal vein; vs = seminal vesicle).

The long and narrow renal tube extends between the heart and the mantle collar (fig. 1, *tr*). In the proximity of the latter it gradually narrows and finally bends to the left as a hook, thus forming the ureter that is provided with a cleft-like subterminal meatus (fig. 1, *u, m*).

The renal tube was 23.84 ± 1.90 mm long, 1.51 ± 0.33 mm wide in the middle portion. The ureter was 2.66 ± 0.36 mm long.

The pulmonary and renal veins (fig. 1, *vp, vr*) lie at the right and left sides of the renal tube, respectively.

From the point of view of systematics, the most important feature of the renal region of *A. glabratus* is the so-called 'renal ridge', a median pigmented fold that runs along the length of the ventral surface of the renal tube (fig. 1, *cr*). Histologically this fold is a rather pulmonary structure.

The renal tube, lined by a columnar epithelium, is enclosed within the membrane that forms the roof of the respiratory cavity (pl. 1, figs. 4, 5, 6, *tr*). Laterally it adjoins the two above mentioned veins (pl. 1, figs. 4, 5, *vp, vr*). On the dorsal and ventral sides it is separated from the dorsal and ventral epithelia of the respiratory membrane by a thin layer derived from the lacunar tissue of the mantle (pl. 1, figs. 4, 5, *ll, ll'*). In a very young animal (5 mm in diameter) this layer of tissue, little developed, shows a number of small blood lacunae (pl. 1, fig. 4, *ll, ll'*). As the animal grows, that layer gradually thickens owing to the swelling of the lacunae (pl. 1, fig. 5, *ll*). The cells of the lacunar network become progressively loaded with melanin granules, so that a pigmented line develops along the path of the future ridge. The characteristic pigmented ridge finally emerges from the renal region (pl. 1, fig. 6, *cr*).

GENITALIA

Hermaphrodite organs

Ovotestis — This organ, occupying the utmost caudal portion of the body, appears as a coiled cornucopia, the base of which looks to the cephalic direction (figs. 1, 2, *ot*). From about the junction of its middle and cephalic thirds forward, the ovotestis is covered, first dorsally and then dorso-laterally, by the digestive gland (fig. 1, *gd*).

The ovotestis was 12.78 ± 1.50 mm long. Its greatest width, in the cephalic extremity, was 1.57 ± 0.26 mm.

The organ is composed of a great number of diverticula, the walls of which are lined by germinal epithelium lying on a slender connective network. The ova and spermatozoa develop together in the same diverticula (pl. 1, figs. 8, 9).

The diverticula empt into an extremely thin-walled ventral canal (figs. 1, 2, *cc*) which starts caudally as a narrow tube that gradually swells, so that it bulges as a pouch on the ventral surface of the cephalic

portion of the ovotestis. After bulging, it suddenly narrows to give origin to the ovisperm duct.

The utmost caudal diverticula are simple, arranged in one row, and empty singly into the collecting canal. They are followed by bi- and trifurcate diverticula, the latter being the most frequent. Of those branched diverticula, the most caudally situated prolong the dorsal row of the simple ones. Then they form groups of either two or three branched units that converge into a common stem through which they join the dorsal wall of the collecting canal. As the latter progressively widens in the cephalic direction, the branched diverticula become more numerous, and gradually develop a fan-like appearance by attaching separately to the dorsal and lateral walls of the collecting canal (fig. 6).

Ovisperm duct — This is a long and thin tube (figs. 1, 2, *co*) starting at the cephalic extremity of the ovotestis and ending at the region of the carrefour. Shortly after its outset it enlarges to form the seminal vesicle.

The first portion of the ovisperm duct, about 1 mm long and 0.10 mm wide, is lined by a columnar ciliated epithelium surrounded by a layer of melanophorus connective cells (pl. 1, fig. 10, *co*). Then the tube gradually swells and convolutes, its walls put forth numerous diverticula, the longest of which may divide into primary branches. After some windings the tube uncoils and narrows again to about 0.10 mm.

The convoluted portion provided with diverticula, always filled with spermatozoa, is the seminal vesicle (figs. 1, 2, *vs;* pl. 1, fig. 10; pl. 2, fig. 1). Its wall is lined by a ciliated epithelium, and shows no glandular structure. Histologically the diverticula resemble the central duct; we were unable, however, to distinguish cilia in their epithelium.

The blind ends of the diverticula are occupied by the heads of the spermatozoa; thus the diverticula may be considered as recesses within which the spermatozoa find a harbor away from the current that flows along the central tube.

The greatest width of the seminal vesicle was 1.14 ± 0.29 mm.

After leaving the vesicle, the ovisperm duct reassumes its primitive aspect and turns to the right ventral side of the body (pl. 1, fig. 7), where it runs along a line parallel to the right bundle of origin of the columella muscle; at the level of the stomach it bends to the ventral midline, and empties into the carrefour.

The whole length of the ovisperm duct, including the non-unwound seminal vesicle, was 13.70 ± 1.68 mm.

Carrefour — The carrefour is a bulbous swelling, lined by ciliated columnar epithelium, into which the ovisperm duct and the excretory duct of the albumen gland enters, and from which the sperm duct and the oviduct arise by independent openings (fig. 2; pl. 2, figs. 2, 3, *ca*).

The carrefour is the last place where normally the ova and spermatozoa of the same individual may be found together. We do not as yet

surely know the mechanism by which each kind of gamete is segregated into its respective duct.

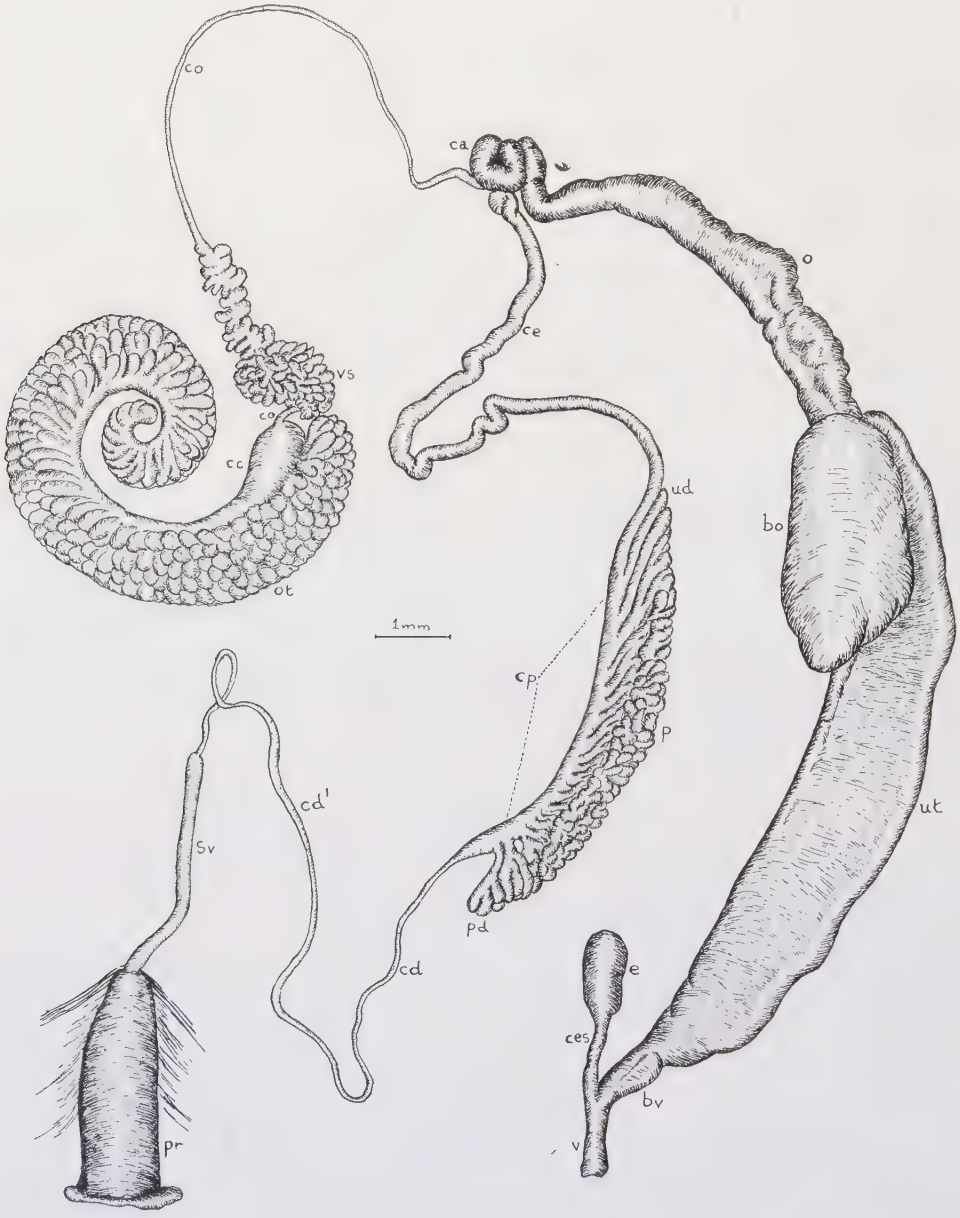


Fig. 2 — Whole genitalia dissected (bo = pouch of the oviduct; bv = vaginal pouch; ca = carrefour; cc = collecting canal of ovotestis; cd = proximal segment of vas deferens; cd' = distal segment of vas deferens; ce = sperm duct; ces = spermathecal duct; co = ovisperm duct; cp = protate duct; e = spermatheca; o = oviduct; ot = ovotestis; p = prostate; pd = foremost prostate diverticulum; pr = preputium; sv = vergic sac; ud = hindermost prostate diverticulum; ut = uterus; v = vagina; vs = seminal vesicle).

MALE ORGANS

Sperm duct — This tube, 14.16 ± 1.27 mm long and 0.23 ± 0.05 mm wide, extends from the carrefour to the beginning of the prostate (figs. 1, 2, *ce*), running along the oviduct, from which it may be easily dissociated. It pursues a sinuous course, chiefly at its first part. Histologically the sperm duct is an epithelial tube of glandular appearance coated with a very thin pigmented connective membrane (pl. 2, figs. 2, 3, *ce*). The non-ciliated chief cells, resembling truncated pyramids, have rounded basal nuclei, and their cytoplasm appears stuffed with refractile granules. Another type of cell seen in the walls of the sperm duct, squeezed among the mentioned ones, is tall and slender and has very pale nucleus and cytoplasm. In cross sections they show a filiform appearance; due to their disposition, they may be termed sustentacular cells. The cytoplasmic granules, distinctly acidophilic in the first part of the sperm duct, are gradually replaced, towards the distal portion, by less acidophilic ones.

Prostate — This organ consists of the prostate duct and its diverticula (figs. 1, 2, *p;* fig. 8). It adheres to the right lateral surface of the uterus, extending from the cephalic swelling of the oviduct to the spermatheca.

The prostate duct (figs. 1, 2, *cp*), 5.53 ± 0.74 mm long, is merely a continuation of the sperm duct, comprised between the points of attachment of the first and last diverticula. It is similar in structure to the distal portion of the sperm duct (pl. 2, fig. 4, *cp*).

The diverticula are arranged in a single row of rather long glandular tubes emptying into the prostate duct. They are histologically identical with the prostate duct in the basal portion of their stalks. The remaining portions of the diverticula exhibit a somewhat different appearance due to cytoplasmic vacuolation and nuclear enlargement in connexion with their greater secretory activity (pl. 2, fig. 4).

The number of diverticula varies from 15 to 30 (mean 21.6 ± 3.5), no correlation being observed between their number and the length of the prostate duct. As an instance we may cite the prostates with 6 mm, which showed from 15 to 27 diverticula.

The diverticula may be simple and branched. The latter may have two, three and more branches (bifurcate, trifurcate and arborescent). With the exception of the three hindermost ones and of anomalous cases, all the others are arborescent.

The last diverticulum was simple in 28, bifurcate in 19, trifurcate in 1, arborescent in 4 cases. The penultimate one was arborescent in 28, bifurcate in 11, simple in 10, trifurcate in 1 case. The antepenultimate was arborescent in 40, bifurcate in 8, simple in 2 cases. Short, either club-shaped or nodular diverticula may occasionally be found at any

position. Small outpocketings may appear at any point on the surface of every diverticulum.

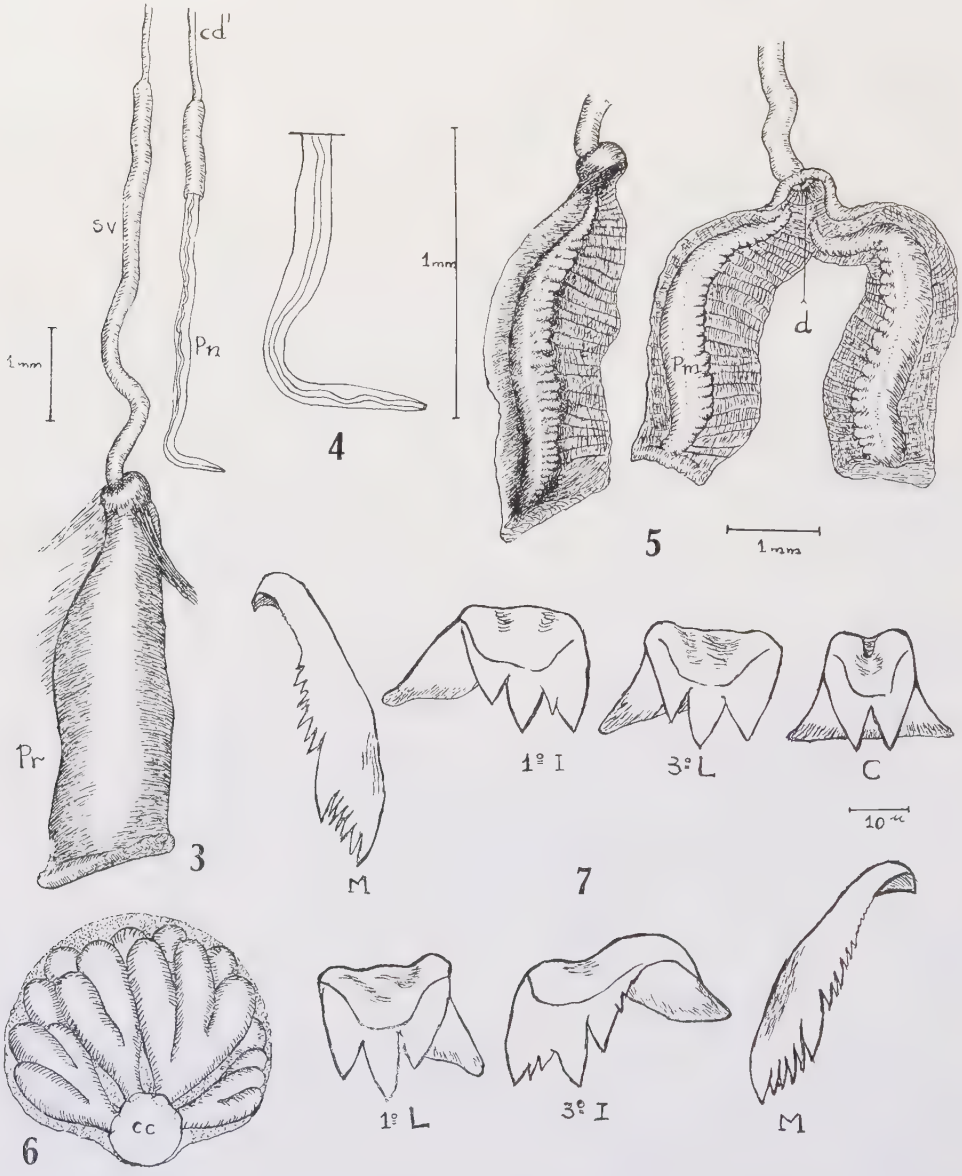


Fig. 3 — Penial complex (left) and verge within vergic sac partly removed (right); fig. 4 — verge, showing apical outlet of sperm canal; fig. 5 — preputium from within; fig. 6 — arrangement of diverticula in cephalic half of ovotestis (diagrammatic); fig. 7 — radula teeth: C, central; L, lateral, 1st and 3rd; I, intermediate, 1st and 3rd; M, marginal. (cc = collecting canal of ovotestis; cd' = distal segment of vas deferens; d = muscular diaphragm between vergic sac and preputium; pm = muscular pilaster in the wall of preputium; pn = verge; pr = preputium; sv = vergic sac).

The branches of the diverticula may be either short or long; they arise either from the same or from different points of their stalk. Primary branches frequently give secondary ones. Arborescent diverticula show at least four ultimate divisions.

In figs. 8 and 9 several aspects of prostate diverticula are shown.

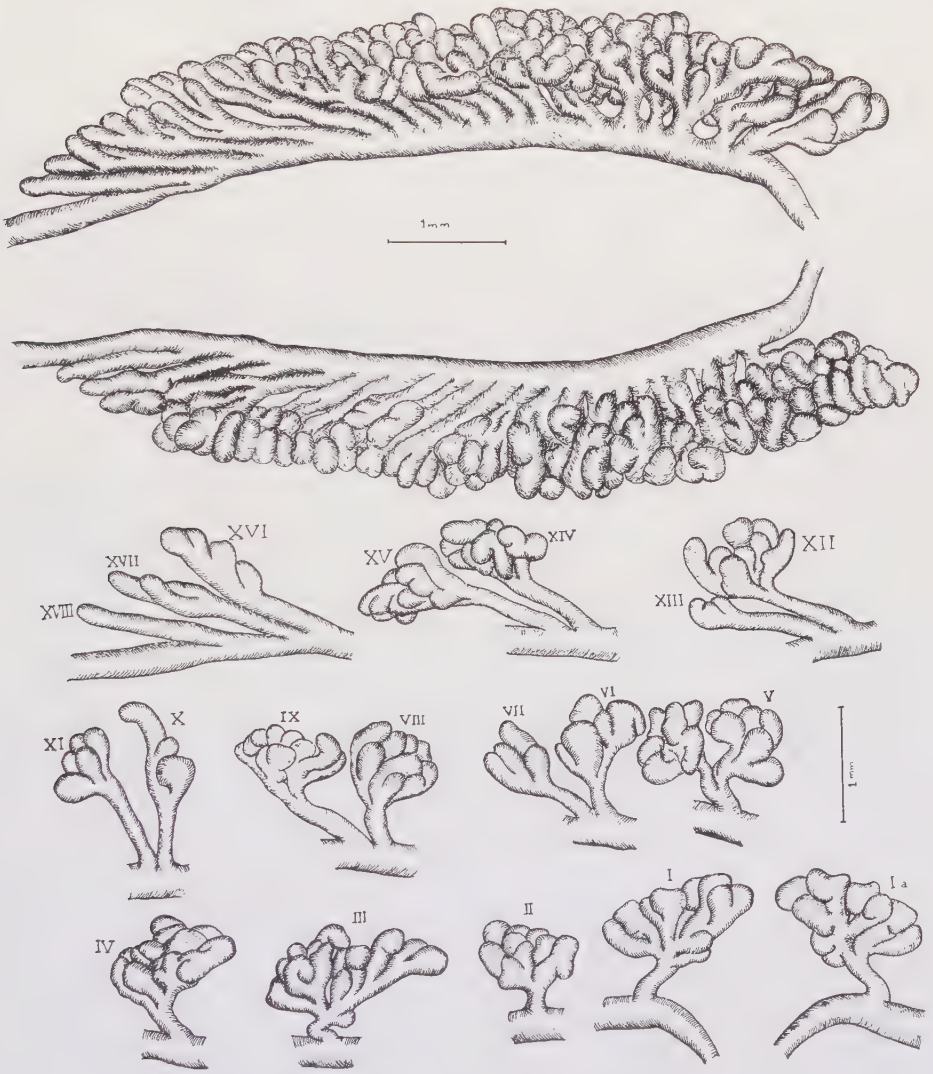


Fig. 8 — Upper: prostate from both sides; lower: diverticula I — XVIII from same prostate (I from both sides).

Vas deferens — The vas deferens appears as a thread (17.50 ± 2.05 mm long and 0.14 ± 0.02 mm wide) extending from the prostate duct to the verge (figs. 1, 2, *cd, cd'*). Small knobs may occasionally be found

at any point of its surface, due to the fixation of peristaltic waves. It leads off from the prostate duct at the level of the blind end of the spermatheca, and pursues its course in the cephalic direction. It then enters the tissues of the neck and runs along the left side of the preputium, reaching a point near the external opening of the latter. At this point the external muscular coat of its wall merges into the adjacent tissues, and the vas deferens loops back as an ascending limb

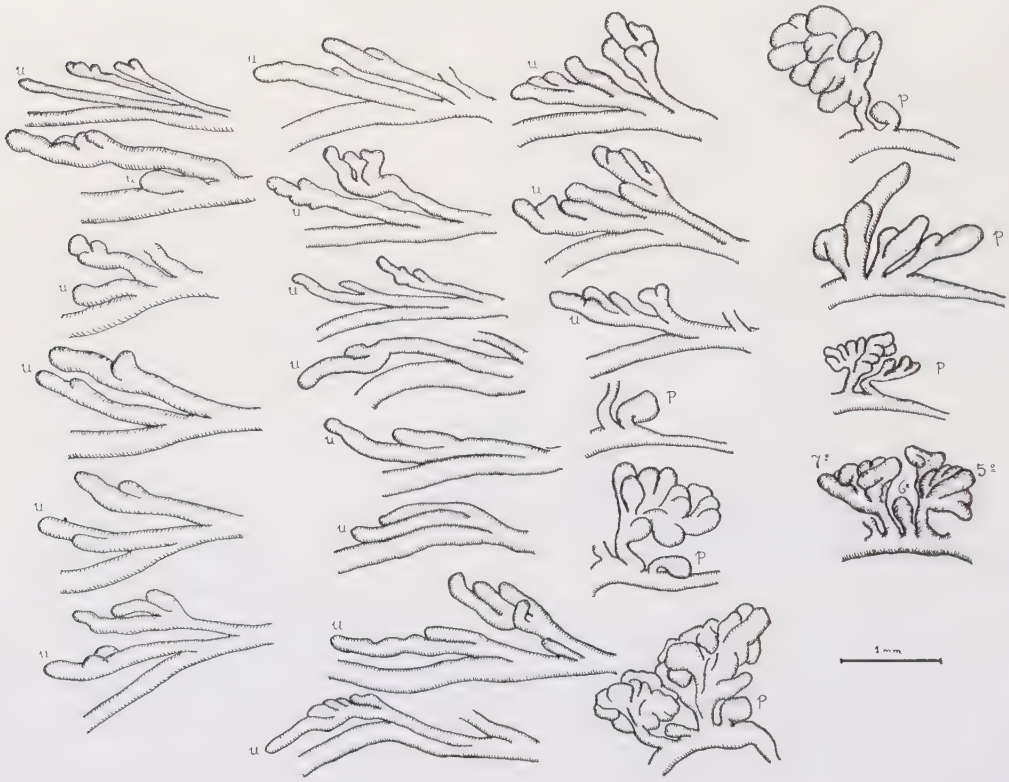


Fig. 9 — Variation of last (*u*), first (*p*) and contiguous prostate diverticula. Anomalous intermediate (VI) diverticulum.

that becomes free into the body cavity to finally reach the base of the verge.

The first part of the vas deferens is histologically similar to the prostate duct (pl. 3, fig. 1). After a short distance, however, its character changes due to the gradual replacement of the epithelial lining cells by cells of a single kind, cuboidal and ciliated. A muscular coat consisting of two rather thin layers, an inner one, circular, and an outer one, longitudinal, appears around the epithelial tube (pl. 3, fig. 2).

The character of the vas deferens does not change histologically as it reaches the point where it loops back in the neck. From this point onwards its lumen progressively becomes narrower, the cells of its epithelial lining become lower and with shorter cilia, and the muscular layers become thicker (pl. 3, figs. 3, 5).

This distal segment of the vas deferens, besides conveying the semen, also performs the function of propelling the verge through the preputium during copulation. The latter function is facilitated by the muscular rigidity and freedom of movements of the duct within the body cavity, and by the fulcrum provided by its attachment to the tissues of the snail neck.

The relation *vas deferens/vergic sac* was 4.7 ± 0.6.

Penial complex — It consists of the verge, vergic sac and preputium.

The *verge* is a differentiation of the distal end of the vas deferens, appearing as a slender tube 3.70± 0.54 mm long and 0.12 ± 0.03 mm wide. Situated within the vergic sac, it is attached to the latter b its base as a narrow cylindric pendant having a pointed free extremity (fig. 4). The axial sperm canal may be seen by transparence through the wall of the verge. There is no penial stylet.

The verge is covered with a visceral squamous epithelium that loops back at the base of the organ to become continuous with the parietal epithelium lining the vergic sac (pl. 3, fig. 6). The sperm canal is lined by a low epithelium continuous with the lining of the vas deferens. The lacunar vergic tissue fills the space between the two epithelial layers (pl. 3, fig. 7).

The *vergic sac,* 3.77 ± 0.50 mm long and 0.19 ± 0.01 mm wide, extends between the vas deferens and the preputium (figs. 1, 2, *sv;* fig. 3). The relation *vergic sac/preputium* was 1 ± 0.02 (the relation 1 was observed in 28 specimens). The wall of the vergic sac is composed of a thin muscular coat lined by a cuboidal epithelium (pl. 3, fig. 7).

The *preputium* (figs. 1, 2, *pr;* figs. 3, 5) is a muscular sac-like tube, 3.79 ± 0.40 mm long and 0.89 ± 0.12 mm wide, deeply pigmented due to the presence of abundant melanophores among the muscular fibers of its wall. The preputium extends from the vergic sac to the male genital opening situated just behind the left tentacle. Before continuing with the vergic sac, its apical end becomes somewhat narrower. On both sides of its wall a strong muscular pilaster extends lengthwise, causing the epithelial lining to protrude toward the lumen of the organ (figs. 5 and pl. 3, fig. 8). The external surface of the preputium has a pilose appearance. Internally the preputium is separated from the vergic sac by a muscular diaphragm that controls the passage of the verge (fig. 5; pl. 3, fig. 9).

Female organs

Albumen gland — This is a voluminous compound tubulous gland that lies on the first portion of the intestine (fig. 1, *ga*). Its dorsal surface is convex and the ventral one is divided into two parts by a furrow occupied by the intestinal loop that passes beneath it. The gland secretions are conveyed by an excretory duct that empties into the carrefour. The cytoplasm of secretory cells that make up the tubuli is highly vacuolated and shows a nucleus disposed toward the base of the cell. The lumens of the tubuli are always filled with a viscid secretion (pl. 2, figs. 2, 3).

Oviduct — The oviduct, 10.24 ± 1.29 mm long and 0.81 ± 0.16 mm wide in its middle portion, leads off from the carrefour, extending to the level of the hindermost prostate diverticula, accompanied by the sperm duct (figs. 1, 2, *o*). It tends to become wider throughout its course. In the proximity of its cephalic end it abruptly swells, thus forming a fold-walled pouch (figs. 1, 2, *bo*) that caps the caudal end of the uterus. Its greatest width in that pouch was 2.34 ± 0.39 mm. The oviduct is lined by a non-ciliated epithelium consisting of two kinds of cells (pl. 3, figs. 4, 10). The columnar chief cells have vary pale cytoplasm and ellipsoidal nuclei. The sustentacular cells, tall and slender, resemble those referred to in the sperm duct. The histological character of the oviduct arises abruptly, no transitional steps existing between its epithelium and that of the carrefour (pl. 2, figs. 2, 3). The oviduct is covered with a thin pigmented membrane of connective tissue.

Uterus — We consider the uterus as that wide tube extending from the pouch of the oviduct to the caudal limit of the vagina. It is 10.58 ± 1.18 mm in length and has a diameter of 1.84 ± 0.32 mm in its middle part.

In dissected specimens the limit between the nidimental gland and the uterus proper cannot be distinguished with any degree of certainty. Histologically, however, the two portions are quite different. The beginning of the nidimental gland is marked by the appearing of strongly acidophilic granules within some epithelial cells at a point dorsally situated in the wall of the cephalic end of the oviduct (pl. 3, fig. 10), at the level of the hindermost prostate diverticulum. From this site the acidophilic granules spread around to the remaining of the gland wall (pl. 4, fig. 1). A progressive restriction of the acidophilic granules to the portion of the wall of the tube that comes into contact with the spermatheca (pl. 4, fig. 3) signalizes the cephalic end of the nidimental gland and the beginning of the uterus. The opposite wall, in which the granules are no longer present, resembles the wall of the oviduct, differing from the latter in their cells being ciliated and staining pale pink with eosin. At the region that touches the spermatheca, the remaining acidophilic cells are finally replaced by vacuolated, ciliated

ones. This character remain unchanged through the entire length of the uterus (pl. 4, fig. 2).

Vagina — The vagina is a tube continuous with the uterus, the two organs being separated externally by a rather shallow partial constriction. Its external orifice opens a short distance behind the male genital outlet (figs. 1, 2, *v*). The swollen part of the vagina which immediately follows the constriction is the vaginal pouch (figs. 1, 2, *bv*). The organ was 2.06 ± 0.15 mm long and 0.32 ± 0.05 mm wide. Its greatest diameter at the pouch was 0.46 ± 0.08 mm.

The wall of the vagina and vaginal pouch has three coats: a lining ciliated columnar epithelium, a moderately muscular coat and a thin pigmented adventitia (pl. 4, figs. 4, 5, 6).

Spermatheca — The bulk and form of this organ depends on the degree of distension of its wall, the latter in turn depending on the degree of repletion of its lumen. When filled it is egg-shaped, when empty it is club-shaped. Its dimensions were 1.57 ± 0.41 mm in length and 0.92 ± 0.23 mm in diameter.

The spermathecal duct arises from the cephalic end of the spermatheca and joins the vagina at the level of the limit between the latter and the vaginal pouch (figs. 1, 2, *ces*). It was 1.15 ± 0.23 mm long and about 0.15 mm wide.

The body of the spermatheca (figs. 1, 2, *e*) is surrounded ventrally by the first segment of the vas deferens, and caudally and dorsally by the foremost prostate diverticulum. It is composed of a thin muscular wall lined by ciliated columnar epithelium and covered with a pigmented membrane of connective tissue (pl. 4, fig. 3). The lumen normally contains a jelly-like substance with more or less changed cells desquamated from the epithelium, acidophilic granules and amorphous material (pl. 4, figs. 2, 3). The semen is stored up in a layer between that substance and the epithelial lining. The animal from which pl. 4, figs. 2 and 3 were taken was grown in isolation, so that its spermatheca contained no spermatozoa.

Histologically the spermathecal duct is similar to the spermatheca, and its epithelial lining presents a wavy appearance in sections (pl. 4, figs. 4, 5).

RADULA

Two snails having anomalous radulae were excluded from the following description.

In the 48 remaining specimens the number of teeth rows varied from 125 to 163 (mean 141.4 ± 9.8). The radula formula ranged from 27-1-27 to 34-1-34; the formula 31-1-31 corresponded to the mode and median, and practically also to the mean, the latter being 30.9 ± 1.7.

As regards the form of the teeth, the following characteristics were observed:

Central tooth (fig. 7, C) — With two cusps extending below the lower margin of the base of attachment. The latter is symmetrical, twice to thrice as wide as the summit of the tooth.

Lateral teeth (fig. 7, L) — From 7 to 11 in number, tricuspid, wider than the central one, with asymmetrical base of attachment, the latter being overlapped by the cusps.

Intermediate teeth (fig. 7, I) — From 3 to 5, tricuspid, showing one or two interstitial cusps between the entocone and mesocone, somewhat more oblique than the lateral teeth. Some small cusps may be present above the ectocone.

Marginal teeth (fig. 7, M) — From 18 to 24, elongated, strongly oblique, the entocone and ectocone splitting into several small cusps arranged obliquely. The base of attachment is narrower than the summit of the teeth. The outermost marginals are short, without serrations, rudimentary.

SUMMARY

The present morphological study of *A. glabratus* was based on the observation of shell, radula, renal region and genitalia of 50 specimens having a shell diameter of 18 mm.

In this summary we record the data pertaining to the characteristics that can be used in systematics. The numerals refer to the means and their standard deviations; no special reference being made, they correspond to length measurements.

Shell: 18 mm in diameter, 5.59 ± 0.24 mm in greatest width, 5 to 6 whorls. Right side umbilicated, left one weakly depressed. Last whorl about thrice as tall as the penultimate one at the aperture, the measurements being taken on the right side. Aperture perpendicular or a little oblique.

Body, extended: 47.06 ± 3.31 mm.

Renal tube: Narrow and elongated, 23.84 ± 1.90 mm, showing a pigmented ridge along its ventral surface.

Ovotestis: 12.78 ± 1.50 mm. Mainly trifurcate diverticula attaching in fan-like manner to the collecting canal (this arrangement is seen to best advantage in the cephalic middle of the ovotestis). The collecting canal greatly swells at the cephalic end, narrowing suddenly as it leaves the ovotestis.

Ovisperm duct: 13.70 ± 1.68 mm, including the non-unwound seminal vesicle. The latter, situated about 1 mm from the beginning of the ovisperm duct, was 1.14 ± 0.29 mm in greatest diameter, and is beset by numerous short diverticula.

Sperm duct: 14.16 ± 1.27 mm, pursuing a sinuous course along the oviduct.

Prostate: Prostate duct 5.53 ± 0.74 mm, collecting a row of long diverticula, the latter 21.6 ± 3.5 in number. Last diverticulum generally simple or bifurcate, penultimate generally arborescent, bifurcate or simple, antepenultimate nearly always arborescent, the remaining ones arborescent. The arborescent diverticula frequently give off secondary branches.

Vas deferens: 17.50 ± 2.05 mm. The ratio *vas deferens/vergic sac* was 4.7 ± 0.6.

Verge: 3.70 ± 0.54 mm long, 0.12 ± 0.03 mm wide. Free end tapering to a point where the sperm canal opens. No penial stylet.

Vergic sac: 3.77 ± 0.50 mm long, 0.19 ± 0.01 mm wide. The length ratio *vergic sac/preputium* was 1 ± 0.02.

Preputium: Deeply pigmented, 3.79 ± 0.40 mm long, 0.89 ± 0.12 mm wide in the middle. Muscular diaphragm between it and the vergic sac. Two muscular pilasters along its lateral walls.

Oviduct: 10.24 ± 1.29 mm, suddenly swollen at the cephalic end so that it forms a folded pouch capping the beginning of the uterus.

Uterus: 10.58 ± 1.18 mm.

Vagina: 2.06 ± 0.15 mm long, 0.32 ± 0.05 mm wide, showing a swelling at its caudal portion, just above the opening of the spermathecal duct.

Spermatheca: 1.57 ± 0.41 mm long, 0.92 ± 0.23 mm wide. Spermathecal duct 1.15 ± 0.23 mm.

Radula: 125 to 163 rows of teeth (mean 141.4 ± 9.8). Radula formula 27-1-27 to 34-1-34 (mean 30.9 ± 1.7).

SUMÁRIO

Foi feito um estudo da morfologia do *A. glabratus*, baseado na observação da concha, da rádula, da região renal e da genitália de 50 espécimes cujas conchas mediam 18 mm de diâmetro.

Apresentamos a seguir os dados referentes aos caracteres utilizáveis na sistemática. Os números representam as médias e seus desvios padrões; não havendo especificação, referem-se a medidas de comprimento.

Concha: 18 mm de diâmetro; 5,59 ± 0,24 mm de largura máxima; 5 a 6 giros. Face direita umbilicada, esquerda pouco deprimida. Último giro cêrca de 3 vêzes mais alto que o penúltimo na abertura, medidas tomadas na face direita. Abertura perpendicular ou ligeiramente oblíqua.

Corpo distendido: 47,06 ± 3,31 mm.

Tubo renal: Longo e estreito. 23,84 ± 1,90 mm. Crista pigmentada longitudinal.

Ovoteste: 12,78 ± 1,50 mm. Divertículos principalmente trifurcados implantando-se em forma de leque sôbre as faces laterais e dorsal do canal coletor (êste aspecto é observado de preferência na metade cefálica do ovoteste). O canal coletor é muito dilatado na extremidade cefálica e ao deixar o ovoteste torna-se bruscamente muito estreito.

Canal ovispermático: 13,70 ± 1,68 mm, incluindo a vesícula seminal enovelada. Vesícula seminal com divertículos curtos, 1,14 ± 0,29 mm de largura máxima, situada a cêrca de 1 mm do início do canal ovispermático.

Canal espermático: 14,16 ± 1,27 mm, correndo sinuoso ao longo do oviduto.

Próstata: Canal prostático mediu 5,53 ± 0,74 mm, recebendo uma fileira de divertículos longos em número de 21,6 ± 3,5, o último geralmente simples ou bifurcado, o penúltimo geralmente arborescente, bifurcado ou simples, o antepenúltimo quase sempre arborescente, os restantes arborescentes. As ramificações dos divertículos arborescentes são freqüentemente de segunda ordem.

Canal deferente: 17,50 ± 2,05 mm. Relação *canal deferente/saco vérgico* igual a 4,7 ± 0,6.

Pênis: 3,70 ± 0,54 mm de comprimento e 0,12 ± 0,03 mm de diâmetro. Extremidade livre pontiaguda, com abertura apical do canal ejaculador, sem estilete penial.

Saco vérgico: 3,77 ± 0,50 mm de comprimento e 0,19 ± 0,01 mm de diâmetro. Relação *saco vérgico/prepúcio* igual a 1 ± 0,02.

Prepúcio: Fortemente pigmentado. 3,79 ± 0,40 mm de comprimento e 0,89 ± 0,12 mm de diâmetro na parte média. Separado do saco vérgico por um diafragma muscular. Percorrido lateralmente por duas pilastras musculares longitudinais.

Oviduto: 10,24 ± 1,29 mm. Na extremidade cefálica dilata-se bruscamente formando grande bôlsa pregueada sôbre o início do útero.

Útero: 10,58 ± 1,18 mm.

Vagina: 2,06 ± 0,15 mm de comprimento e 0,32 ± 0,05 mm de diâmetro. Na parte caudal apresenta uma dilatação em forma de bôlsa, logo acima da implantação do canal da espermateca.

Espermateca: 1,57 ± 0,41 mm de comprimento e 0,92 ± 0,23 mm de diâmetro. Canal da espermateca 1,15 ± 0,23 mm.

Rádula: 125 a 163 filas de dentes (média 141,4 ± 9,8). Fórmula radular de 27-1-27 a 34-1-34 (média 30,9 ± 1,7).

REFERÊNCIAS

Baker, F.C., 1945, *The molluscan family Planorbidae,* xxxvi + 530 pp., Univ. Illinois Press, Urbana.

Bustorff-Pinto, D. & Deslandes, N., 1953, Contribuição ao estudo da sistemática de planorbídeos brasileiros. *An. X Congr. Bras. Hig.,* pp. 398-423.

Deslandes, N., 1951, Técnica de dissecação e exame de planorbídeos. *Rev. S.E.S.P.,* 4 (2): 371-382.

Lutz, A., 1918, Caramujos de água doce do gênero Planorbis, observados no Brasil. *Mem Inst. Oswaldo Cruz,* 10 (1): 65-82.

Lutz, A., 1934, Transmission du *Schistosoma mansoni* dans l'Etat de Minas Gerais (Brésil) par le *Planorbis centimetralis*. *C. R. Soc. Biol.,* Paris, 116 (26): 1149-1150.

Paraense, W.L. & Malheiros Santos, J., 1950, Dados negativos sôbre a ocorrência do *Tropicorbis centimetralis* em Belo Horizonte (Estado de Minas Gerais). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 48: 199-212.

Pilsbry, H.A., 1934, Review of the Planorbidae of Florida, with notes on other members of the family. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.,* 86: 29-66.

Scott, J.A., 1940, Venezuelan snails of the genus *Australorbis*. *Not. Nat. Acad. Nat. Sci. Phila.*, 54: 1-13.

PLATE 1

Fig. 1 — Shells of four specimens, right side; fig. 2 — same specimens, left side; fig. 3 — shells of four specimens, front; fig. 4 — cross section through middle of renal tube from snail 5 mm in diameter: no renal ridge (100x); fig. 5 — idem from snail 10 mm in diameter: no renal ridge, pigment in cells of lacunar reticulum (100x); fig. 6 — idem from snail 18 mm in diameter: renal ridge, pigment in lacunar reticulum (100x); fig 7 — ovisperm duct after leaving seminal vesicle (200x); figs. 8 and 9 — ovotestis diverticula (200x); fig. 10 — seminal vesicle, the arrow indicates the blind end of a diverticulum occupied by heads of spermatozoa (100x). (car = respiratory cavity; co = ovisperm duct; cr = renal ridge; gd = digestive gland; ll = layer of lacunar tissue between renal tube and ventral epithelium of dorsal membrane of mantle; ll' = layer of lacunar tissue between renal tube and dorsal epithelium of dorsal membrane of mantle; ot = ovotestis; tr = renal tube; vp = pulmonary vein; vr = renal vein).

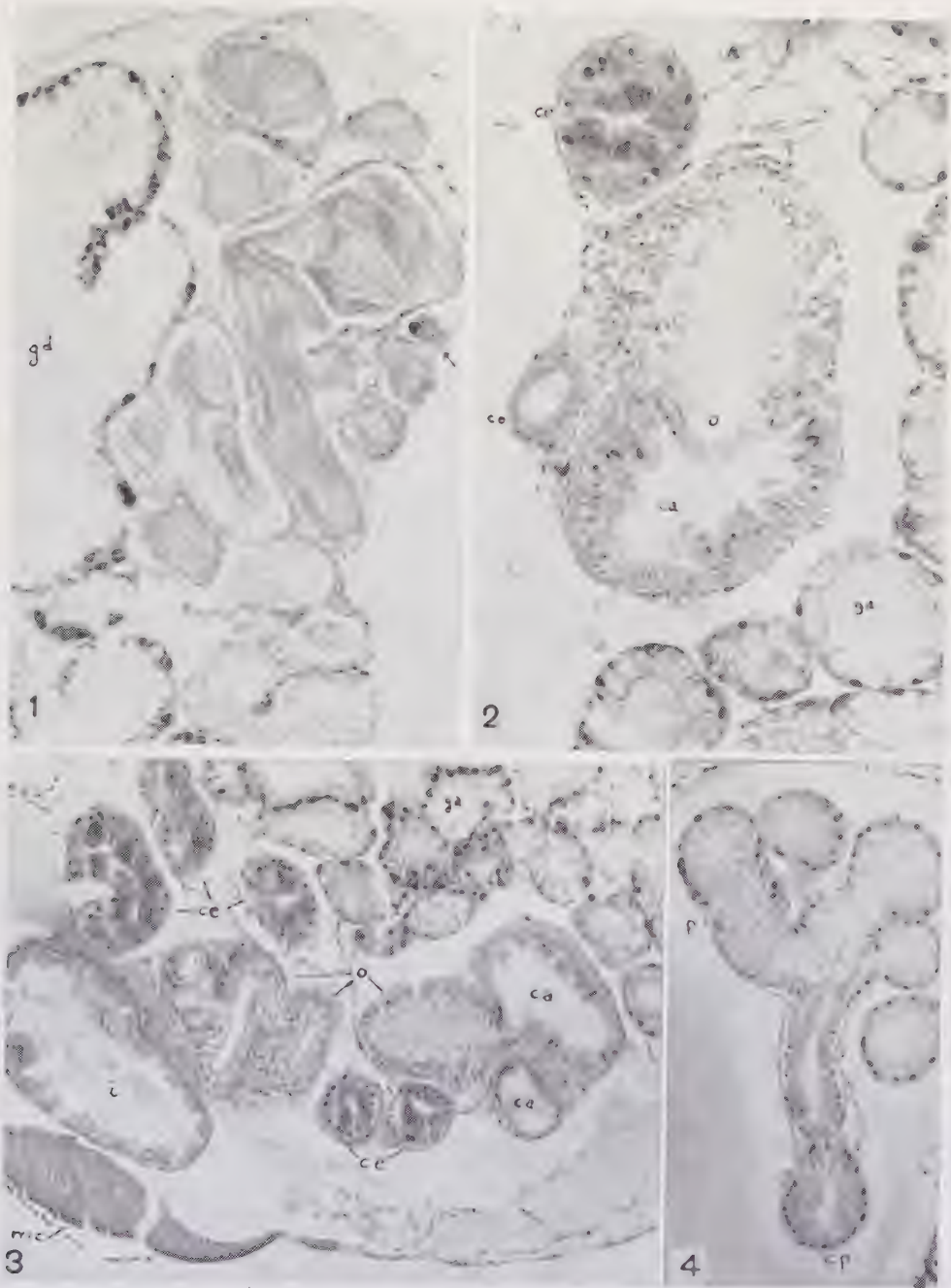
Mem. Inst. Oswaldo Cruz
Tomo 53 (1), 1955

Paraense & Deslandes: Morphology of Australorbis glabratus

PLATE 2

Fig. 1 — Seminal vesicle, the arrow indicates the blind end of a diverticulum occupied by heads of spermatozoa (100x); fig. 2 — region of carrefour (100x); fig. 3 — region of carrefour, showing beginning of oviduct (200x); fig. 4 — prostate diverticulum (100x); (ca = carrefour; ce = sperm duct; co = ovisperm duct; cp = prostate duct; ga =albumen gland; gd = digestive gland; i = intestine; mc = columella muscle; o = oviduct; p = prostate).

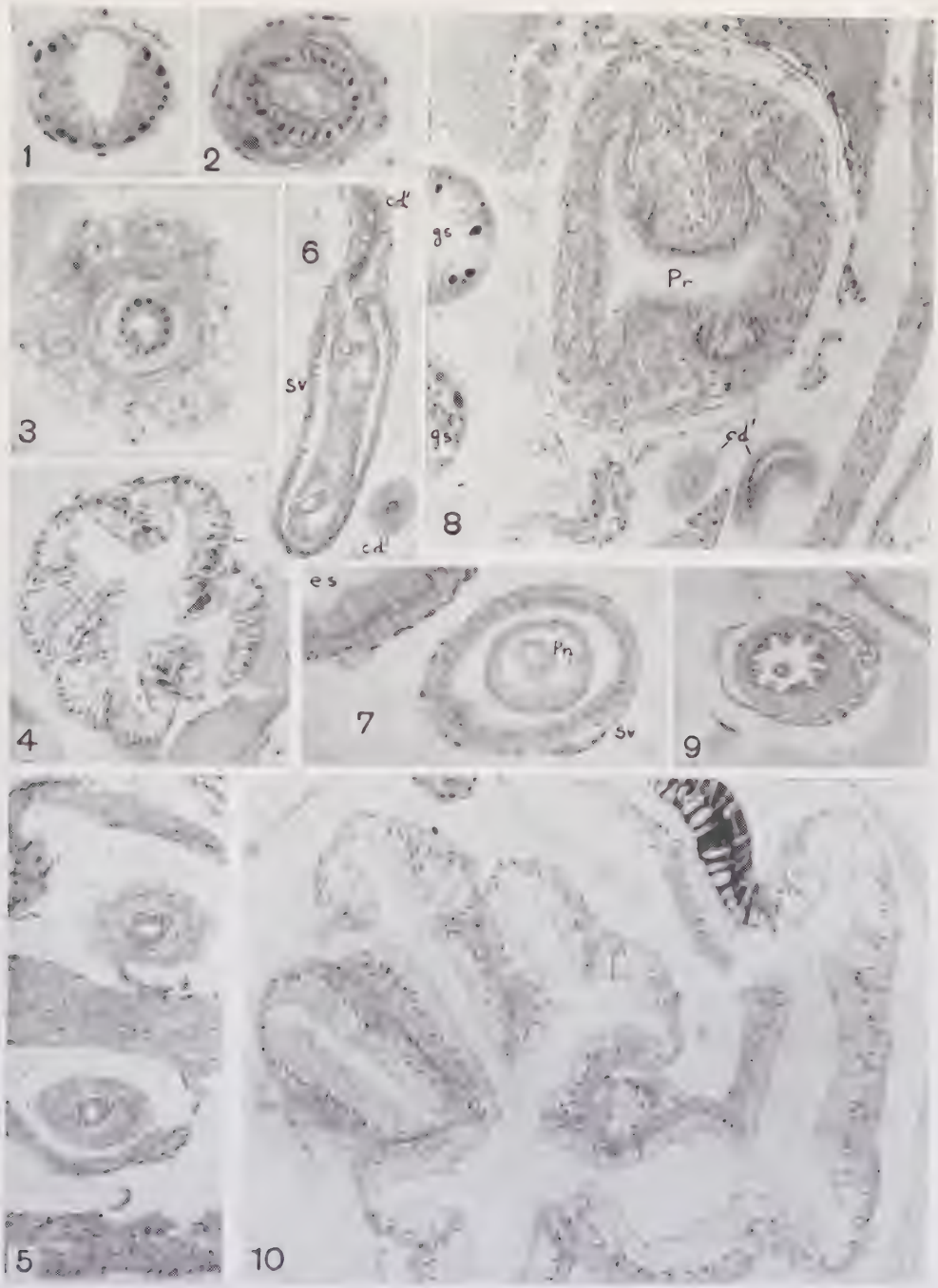
PLATE 2



Paraense & Deslandes: Morphology of Australorbis glabratus

PLATE 3

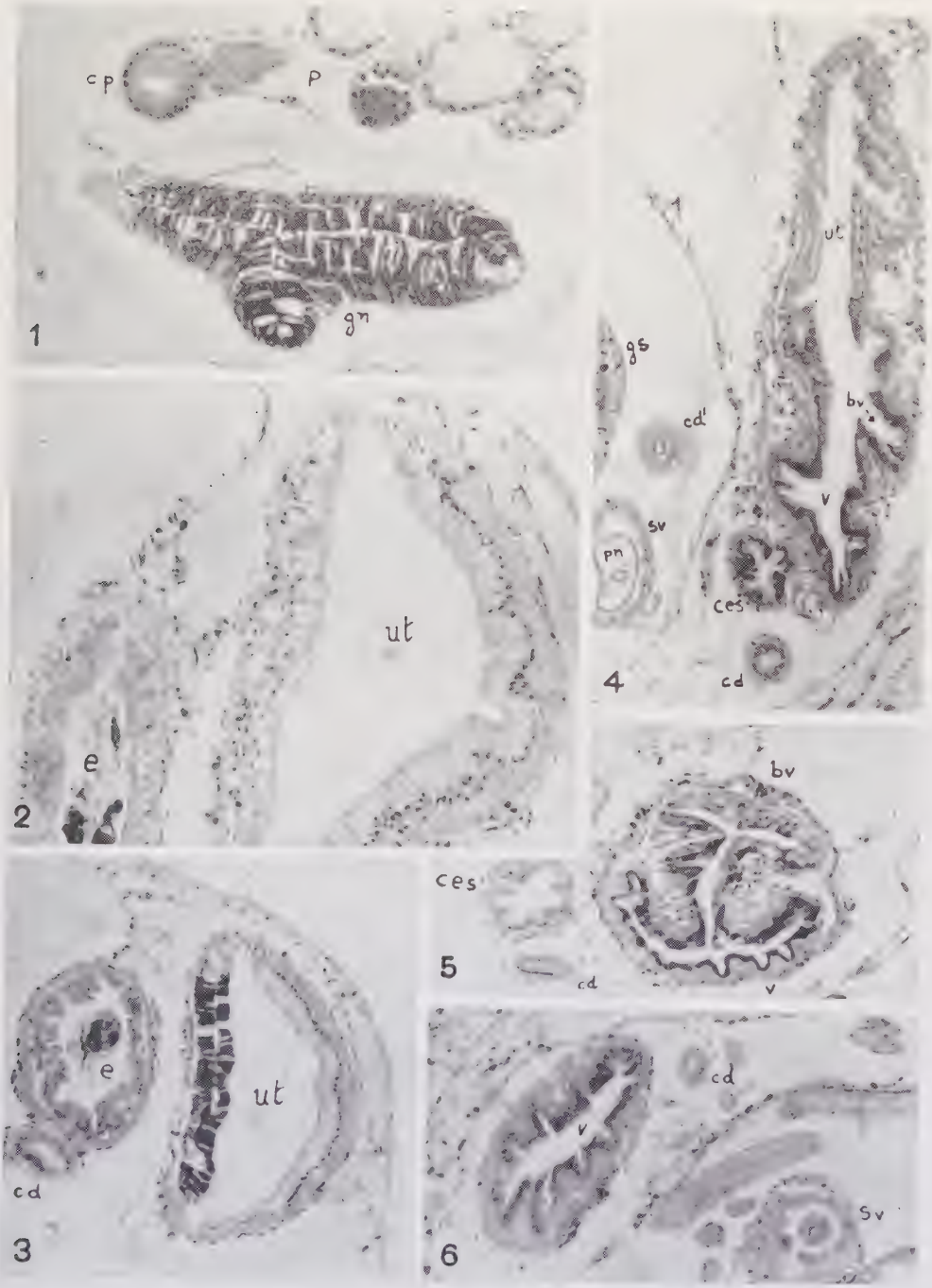
Fig. 1 — Vas deferens, near prostate duct (200x); fig. 2 — vas deferens, proximal segment (400x); fig. 3 — vas deferens, distal segment (400x); fig. 4 — oviduct (100x); fig. 5 — descending and ascending limbs of vas deferens loop (distal segment) near preputium (200x); fig. 6 — verge within vergic sac, showing transition to vas deferens (100x); fig. 7 — verge and vergic sac (200x); fig. 8 — preputium (100x); fig. 9 — diaphragm between vergic sac and preputium, in center apical end of verge (100x); fig. 10 — pouch of oviduct, upper right: beginning of nidimental gland (100x). (cd' = distal segment of vas deferens; es = esophagus; gs = salivary gland; pn = verge; pr = preputium; sv = vergic sac).



Paraense & Deslandes: Morphology of Australorbis glabratus

PLATE 4

Fig. 1 — Nidimental gland in cross section (100x); fig. 2 — uterus and spermatheca (200x); fig. 3 — transition from nidimental gland to uterus, spermatheca (100x); fig. 4 — vagina continuing into uterus, spermatheca duct (100x); fig. 5 — vagina and vaginal pouch in cross section (100x); fig. 6 — vagina in cross section (100x). (bv = vaginal pouch; cd = proximal segment of vas deferens; cd' = distal segment of vas deferens; ces = spermathecal duct; cp = prostate duct; e = spermatheca; gn = nidimental gland; gs = salivary gland; p = prostate; pn = verge; sv = vergic sac; ut = uterus; v = vagina).



Paraense & Deslandes: Morphology of Australorbis glabratus

Sôbre u'a modificação do meio de Monteverde

Gobert Araujo Costa e **Carlos Solé Vernin**
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D.F.

Os diversos meios de cultura usados no diagnóstico presuntivo de colônias isoladas de placas de meios seletivos para enterobactérias, nem sempre orientam corretamente o diagnóstico dêsses germes. A necessidade de se obter um meio que forneça o máximo de indicações certas se impõe, uma vez que muito se economizará em tempo e gasto de material.

Isto é especialmente importante em serviços onde o trabalho de rotina em enterobactérias requer um diagnóstico presuntivo de grupo o mais certo e o mais rápido possível, com evidente diminuição do número de colônias suspeitas a serem identificadas.

Vários meios têm sido propostos com esta finalidade (1-9) baseados na fermentação da lactose, sacarose e glicose, bem como producão de hidrogênio sulfurado, associados ou não à prova de hidrólise da uréia, para separação dos *Proteus*.

Em comunicação feita à "Society of American Bacteriologists", Secção do Rio de Janeiro, em dezembro de 1952, mostramos que êsses meios não dão grande segurança nos resultados obtidos e apresentamos, para contornar êsse inconveniente, u'a modificação do meio de Monteverde. No presente trabalho será dada a técnica de sua preparação e de interpretação dos resultados. Também apresentaremos os primeiros dados obtidos com a aplicação do meio na rotina diagnóstica de enterobactérias.

MÉTODOS

Numa tentativa de obter indicações mais precisas na separação de enterobactérias, experimentamos vários dos meios acima citados, resultando que, em uma apreciação comparativa da eficiência dos mesmos o proposto por Monteverde mostrou-se superior aos demais.

Como um diagnóstico mais acertado em enterobactérias requer maior número de provas, procuramos melhorar o meio de Monteverde de modo a obter outras indicações bioquímicas e, também, massa de germes para o estudo sorológico imediato.

O meio de Monteverde fornece as seguintes indicações: a) ataque ou não à lactose; b) ataque ou não à uréia; c) mobilidade.

Tentamos obter mais informações usando o artifício de Zia (8) colocando camadas superpostas: uma de meio semi-sólido, permitindo as verificações de Monteverde, e outra sólida fornecendo-nos massa de germes e outras indicações bioquímicas. Além disto, outras modificações na composição do meio foram tentadas.

De início pensamos no uso da glicose, que se presta, no tríplice açúcar, para a separação da *Salmonella typhi* das outras salmonelas, pela produção ou não de gás. No entanto, em nada melhorou o meio pois, ao contrário, impossibilita as leituras da mobilidade, caráter importante para o diagnóstico.

Com a junção de uma camada de meio sólido sôbre o meio semi-sólido verificamos, com a incubação a 37º, o aparecimento freqüente de bolhas de gás na massa do meio semi-sólido, dificultando as leituras.

Êste fato já havia sido assinalado por Archambault & Mc Crady (10) trabalhando com meios líquidos de fermentação. Encontraram êstes pesquisadores de 4 a 100% de tubos com gás formado espontaneamente quando os conservava na geladeira e incubava-os depois a 37ºC. Como solução a êste problema Archambault & Mc Crady adotam a conservação do meio na temperatura ambiente.

Em nossas verificações podemos confirmar o trabalho citado. Não aconselhamos, contudo, a conservação na temperatura ambiente pois também houve produção espontânea de gás. Adotamos como norma conservar os tubos na estufa a 37ºC logo após a saída do autoclave, e aí mantê-los até semeadura.

Procuramos verificar se as modificações na concentração do agar semi-sólido trariam melhoria na fermentação, utilisando várias concentrações, de 0,3 a 0,75% sendo a de 0,5% a melhor.

O meio de Monteverde é esterilizado em autoclave, juntamente com a uréia e a lactose. Esta prática nos mostrou uma acentuada decomposição da uréia e hidrólise da lactose e sacarose usadas. O meio, depois de pronto, apresentava-se com tonalidade azulada e, quando semeado com germes que seguramente não o alterariam apresentava ligeira acidificação mostrando existir fermentação. Esta dificuldade foi resolvida fazendo-se a esterilização dos açúcares e da uréia por filtração, com junção posterior ao meio esterilizado.

A modificação da superposição de uma camada sólida ao meio de Monteverde traria como vantagens a possibilidade de obtermos massa de germes para sorologia, verificação da produção de hidrogênio sulfurado e do indol.

Para a verificação da produção do hidrogênio sulfurado usamos como fonte de enxôfre o tiosulfato e como indicador o ferro, à semelhança do meio de tríplice açúcar. Tentamos outros indicadores, como os sais solúveis de bismuto, mas os resultados não foram de molde a serem usados. Além do mais, Pacheco & Peres haviam demonstrado a inferioridade dos sais solúveis como indicadores de hidrogênio sulfurado em comparação com os insolúveis de bismuto (12).

Para a verificação do indol usamos peptona seguramente rica em triptofano; colocávamos papel de filtro embebido em reativo de Ehrlich,

para testar a produção do gás. Procuramos verificar, também, se haveria alguma alteração na estrutura antigênica das bactérias semeadas neste meio, de modo a impossibilitar a identificação sorológica. Testamos as amostras de *Shigella* e *Salmonella* nêle semeadas, sendo perfeitamente possível sua classificação sorológica com sôros polivalentes e monovalentes de grupo e flagelares.

Monteverde utiliza no seu meio apenas a lactose como açúcar separador. Na modificação proposta introduzimos a sacarose, pois, em nosso meio, freqüentemente encontramos germes que fermentam a sacarose mais ràpidamente do que a lactose.

Quanto ao indicador de reação usado foi o mesmo estabelecido por Monteverde. Experimentamos vários outros, como o vermelho de cresol, as misturas propostas por Singer (4) e o vermelho de fenol. O melhor foi sem dúvida, quanto à sensibilidade, o de Monteverde.

Tomando por base tôdas as verificações acima descritas preparamos o meio da seguinte forma.

A — Azul de timol ..... 1,6 g
NaOH 0,1/N ..... 34,4 ml
Água ..... 65,6 ml

B — Indicador de Andrade

C — Solução de uréia e açúcares:

Uréia ..... 20,0 g
Lactose ..... 30,0 g
Sacarose ..... 30,0 g
Água ..... 100,0 ml

Aquecer a mistura para dissolver. Esterilizar por filtração em Seitz. Guardar na geladeira.

1) *Agar semi-sólido* — Peptona Difco ..... 2,0 g
NaCl ..... 0,5 g
Agar ..... 0,5 g
Água ..... 100,0 ml

Ferver para dissolver. Ajustar o pH com NaOH N/10 a 7,3-7,4. Ferver para precipitar. Filtrar em algodão. Juntar os indicadores: azul de timol 0,3 ml e Andrade 1,0 ml. Distribuir em balões em volumes de 100 ml a 200 ml. Esterilizar em autoclave a 115°C. No momento de preparar o meio, fundir o conteúdo dos balões, esfriar a 48-50°C e juntar assèticamente a solução "C" de açúcares com uréia na preparação de 10 ml para cada 100 ml de meio.

2) *Agar sólido* — Peptona ..... 1,5 g
Tripticase ou outra peptona com triptofano ..... 0,5 g
Agar ..... 2,0 g
Água ..... 100,0 ml

Ferver em fogo brando para dissolver. Ajustar o pH a 7,3-7,4 com NaOH N 10. Ferver novamente para precipitar. Filtrar em algodão. Juntar o sulfato ferroso amoniacal: 0,02 g e tiosulfato de sódio: 0,02 g. Adicionar os indicadores: azul de timol 0,3 ml e Andrade 1,0 ml. Distribuir em balões com volumes de 100 a 200 ml e esterilizar em autoclave a 115°C por 15 minutos. No momento de usar fundir o meio, resfriar a 48-50°C e juntar assèticamente 10 ml das soluções de uréia e açúcares para cada 100 ml do meio.

3) *Preparo final do meio* — Distribuir primeiro o agar semi-sólido em tubos de 12 x 120 mm colocando-se 2,5 ml em cada tubo. Deixa-se solidificar na temperatura ambiente em posição vertical. Distribuir o meio sólido sôbre esta parte semi-sólida, também em volumes de 2,0 a 2,5 ml e inclinar para solidificar. Dêste modo, tem-se uma camada inferior de meio semi-sólido com uma altura de 12 a 15 mm. Incubam-se os tubos na estufa a 37°C durante 24 horas. Examinam-se todos os tubos para desprezar os que tiverem bolhas de ar. Conservar o meio na estufa até o momento de usar. *Não se deve guardar o meio na geladeira.*

4) *Semeadura* — Deve ser feita inoculando-se o meio com uma agulha, a semelhança do que se faz com o meio de tríplice açúcar. A picada deve ser feita até a metade da parte semi-sólida, fazendo-se depois a estria na superfície da parte sólida.

Após a semeadura coloca-se uma tira de papel de filtro presa à rolha dos tubos e embebida em reativo de Ehrlich. Incuba-se durante 24 a 48 horas a 37°C.

INDICAÇÕES FORNECIDAS

Além da massa de germes que obtemos para as provas sorológicas, o meio permite as seguintes leituras:

1) Ataque à lactose ou sacarose, com produção de ácido, virando a côr do meio para vermelho.
2) Produção de gás pelo ataque à lactose ou sacarose, com acidez do meio.
3) Produção de hidrogênio sulfurado visível, pelo escurecimento da parte sólida do meio.
4) Mobilidade, pela turvação difusa do meio na parte semi-sólida. Quando imóvel o germe, êste só cresce na picada.
5) Hidrólise da uréia, visível em todo o meio, com mudança da côr para azul.
6) Produção de indol, evidenciada pela reação do papel embebido no reativo de Ehrlich. A produção do indol não pode ser observada nas amostras indol positivas que acidificam a superfície do meio (11).

LEITURA DOS RESULTADOS

A leitura é feita com 24 horas de incubação a 37ºC mas em certos casos, como nos para-coli e certas amostras do grupo coli, uma observação prolongada até 48 horas fornece-nos melhores resultados. Os diferentes gêneros de bactérias intestinais se comportam neste meio do seguinte modo.

Salmonella — A côr do meio permanece inalterada, com escurecimento na parte sólida quando houver produção de hidrogênio sulfurado. A superfície tende para a alcalinidade (côr esverdeada ou azulada). Não há produção de gás. Indol negativo. Movel ou imóvel.

Shigella — A côr do meio permanece inalterada no início do período de incubação mudando para vermelho quando a amostra é fermentadora tardia da lactose ou sacarose. A superfície tende para a alcalinidade (esverdeada ou azulada). Indol positivo ou negativo. Imóvel e ausência de gás e hidrogênio sulfurado.

Proteus — A côr do meio geralmente muda para azul e algumas vêzes para verde (amostras urease positivas tardias) com escurecimento da parte sólida pela produção de hidrogênio sulfurado. Mobilidade positiva ou negativa. Indol positivo. Gás presente ou ausente. As amostras que atacam ràpidamente a sacarose podem dar uma côr amarelo-esverdeada ao meio, algumas vêzes a intensa côr azul do meio dificulta a leitura da produção de hidrogênio sulfurado.

Escherichia e *Klebsiella* — Devido à fermentação dos açúcares a côr do meio é vermelha ou amarelada (quando há redução) com grande produção de gás. Mobilidade positiva ou negativa. Geralmente não se pode observar a produção do indol.

Paracoli — As amostras fermentadoras da lactose ou sacarose dão as reações de *Escherichia*. As amostras fermentadoras tardias ou não fermentadoras da lactose dão as reações de *Salmonella*. Algumas vêzes o indol é positivo e há produção do hidrogênio sulfurado.

Pseudomonas — A côr do meio fica inalterada. A superfície tende para alcalinidade. Não se pode observar a mobilidade, pois não há crescimento no meio semi-sólido.

Alkaligenes — A côr do meio não se altera. A superfície tende para alcalinidade.

RESULTADOS OBTIDOS

Inicialmente o meio foi experimentado usando-se algumas amostras de coleção e outras recentemente isoladas: *Salmonella* 100; *Shigella* 40; *Proteus* 60; *Coli* 30; *Pseudomonas* 5; *Klebsiella* 3; *Paracoli* 80.

Além da semeadura no meio proposto fizemos, no início do trabalho, um estudo comparativo da sua eficiência no acerto diagnóstico com

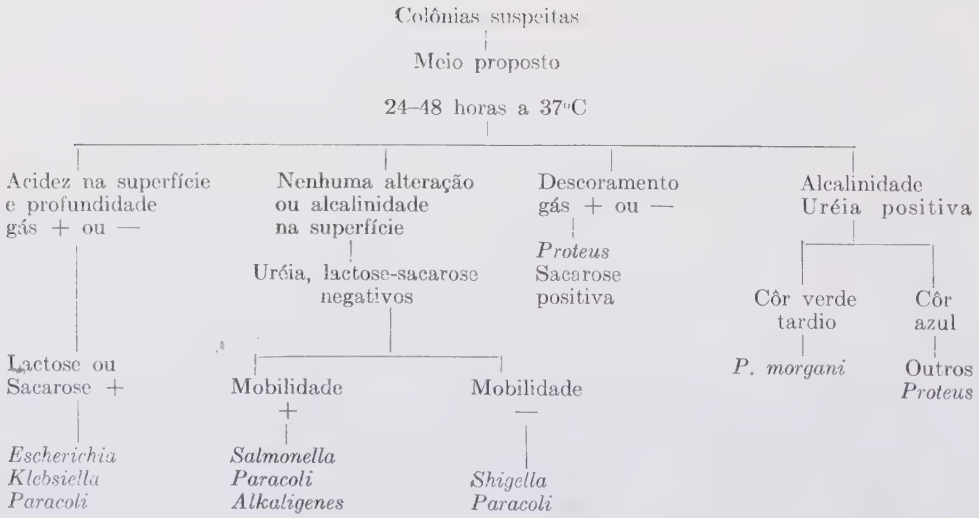
outros meios de triagem usando 71 amostras do grupo coli e paracoli fermentadores lentos ou rápidos da lactose. Resultou desta comparação baixo rendimento do meio que RUGAI propuzera, com apenas 33,8% de resultados corretos; o de SINGER com sòmente 40,8%; ambos ficaram bem abaixo dos dados numéricos fornecidos pelo tríplice açúcar com 57,8% de acêrto diagnóstico.

É preciso frisar que o tríplice açúcar tão largamente usado nos Estados Unidos fornece resultados medíocres em comparação com os meios de SURRACO-PEREIRA com 69% e MONTEVERDE com 83,1%. Conseguimos, com a modificação proposta, obter um rendimento de cêrca de 8% a mais de acêrto (91,5%) do que o meio de Monteverde, naturalmente pelo maior número de provas fornecidas pelo meio proposto.

Recentemente SUASSUMA (13) fornece-nos os resultados da utilização da modificação proposta, no estudo de 2 399 colônias isoladas de 87 coproculturas para o diagnóstico de *Salmonella* e *Shigella* sendo 1 892 ou sejam 78,8% sumàriamente afastadas pela rápida ação sôbre a lactose, sacarose, ou uréia. Examinando as 507 colônias consideradas como suspeitas de *Salmonella* e *Shigella,* SUASSUMA pôde fazer provas bioquímicas de modo a ter posteriormente confirmação ou não das indicações fornecidas pelo meio.

Dêste modo foi possível, com o meio proposto, uma separação de 30% de amostras fermentadoras tardias não pertencentes aos gêneros *Salmonella* e *Shigella* as quais passariam despercebidas com o uso dos meios correntes. A nossa experiência permite-nos dizer que o meio é de grande utilidade nos laboratórios de rotina diagnóstica de enterobactérias. Se bem que a sua execução seja um pouco trabalhosa, não há, pràticamente, contaminação nas várias manipulações do seu preparo e os resultados obtidos são de tal ordem que compensam grandemente o esfôrço dispendido na confecção.

Sugerimos como norma para sua utilização na rotina o esquema abaixo:



CONCLUSÕES

É proposta uma modificação do meio de Monteverde que, apezar de ser mais trabalhosa no preparo, fornece um grande número de informações. Com êste meio obtem-se uma série de indicações bioquímicas e massa de germes para sorologia.

É sugerido o seu emprêgo na rotina diagnóstica de enterobactérias uma vez que os resultados obtidos mostram sua superioridade sôbre os demais meios experimentados nos acertos diagnósticos.

SUMMARY

It is well known that the culture media used in the presumptive diagnosis of suspicious colonies from plates inoculated with stools for isolation of enteric organisms do not always correctly indicate the major groups of enterobacteria.

In an effort to obtain a medium affording more exact indications, several media (1-9) have been tested. Modifications of some of these media have also been tested with the result that a satisfactory modification of Monteverde's medium was finally selected. This proved to be most satisfactory, affording, as a result of only one inoculation, a complete series of basic indications. The modification involves changes in the formula, in the method of preparation and in the manner of storage.

The formulae are:

A.	Thymol blue indicator:	NaOH 0.1/N	34.4 ml
		Thymol blue	1.6 g
		Water	65.6 ml
B.	Andrade's indicator		
C.	Urea and sugar solution:	Urea	20 g
		Lactose	30 g
		Sucrose	30 g
		Water	100 ml

The mixture (C.) should be warmed slightly in order to dissolve the ingredients rapidly. Sterilise by filtration (Seitz). Keep stock in refrigerator.

The modification of Monteverde's medium is prepared in two parts.

Semi-solid part — Peptone (Difco) 2.0 g; NaCl 0.5 g; Agar 0.5 g; Water 100.0 ml. Boil to dissolve the ingredients. Adjust pH with NaOH to 7.3-7.4. Boil again for precipitation. Filter through cotton. Add indicators "A" 0.3 ml and "B" 1.0 ml. Sterilise in autoclave 115°C, 15 minutes in amounts not higher than 200 ml. Just before using, add solution "C" asseptically in amounts of 10 ml to 200 ml of the melted semi-solid medium, maintained at 48-50°C.

Solid part — Peptone (Difco) 1.5 g; Trypticase (BBL) 0.5 g; Agar 2.0 g; Water 100,0 ml. Boil to dissolve the ingredients. Adjust pH with NaOH to 7.3-7.4. Boil again. Filter through cotton. Add indicators "A" 0.3 ml and "B" 1.0 ml; ferrous ammonium sulfate 0.02 g; sodium thiosulfate 0.02 g. Sterilise in autoclave 115°C, 15 minutes in amounts not higher than 200 ml. Just before using, add solution "C" asseptically in amounts of 10 ml to 200 ml of the melted solid medium, maintained at 48-50°C.

Final medium — The semi-solid part is dispensed first (tubes about 12 x 120 mm) in 2.5 ml amounts and left to harden at room temperature, in vertical position. The solid part is dispensed over the hardened semi-solid one in amounts from 2.0 ml to 2.5 ml and left to harden in slant position, affording a butt of 12 to 15 mm. The tubes of medium should be subjected to a sterility test in the incubator, overnight. Tubes showing spontaneous gas bubbles (air) should then be discarded. The medium should be stored in the incubator (37°C), for not more than 2 to 4 days. Storage of the tubes in the ice-box produces the absorption of air which is released as bubbles when the tubes are incubated at 37°C after inoculation. This fact confirmed the observation of Archambault & McCrady (10) who worked with liquid media and the aplication of their observation was found to be essential to the proper working conditions of this double-layer medium.

Inoculation — The inoculation is made by means of a long straight needle, as is usually done on the triple sugar, but the needle should penetrate only to about half of the height of the semi-solid column.

Indol detection — After inoculation, a strip of sterilized filter paper previously moistened with Ehrlich's reagent, is suspended above the surface of the medium, being held between the cotton plug and the tube.

Indications given — In addition to providing a mass of organisms on the slant for serological invetigations, the medium gives the following indications:

1. Acid from lactose and/or sucrose (red, or yellowsh with strains which reduce the indicators).
2. Gas from lactose and/or sucrose (bubbles).
3. H_2S production, observed on the solid part (black).
4. Motility observed on the semi-solid part (turbidity).
5. Urease production, observed on solid and semi-solid parts (blue).
6. Indol production, observed on the strip of filter paper (red or purplish). Indol production is not observed with indol positive strains which rapidly acidify the surface of the slant, and the use of oxalic acid has proved to give less sensitive reaction (11).

Reading of results — In most cases overnight incubation is enough; sometimes the reactions appear within only a few hours of incubation, affording a definite orientation of the diagnosis. With some cultures it is necessary to observe the medium during 48 hours of incubation. A description showing typical differential reactions follows:

Salmonella: Color of the medium unchanged, with blackening of the solid part when H_2S is positive. The slant tends to alkalinity (greenish or bluish). Gas always absent. Indol negative. Motility positive or negative.

Shigella: Color of the medium unchanged at the beginning of incubation period, but acquiring a red color when the strain is late lactose sucrose positive. Slant tending to alkalinity (greenish or purplish). Indol positive or negative. Motility, gas and H_2S always negative.

Proteus: Color of the medium generally changes entirely to blue or sometimes to green (urease positive delayed), with blackening of solid part when H_2S is positive. Motility positive or negative. Indol positive. Gas positive or negative. The strains which attack rapidly sucrose may give a yellow-greenish color to the medium. Sometimes the intense blue color of the medium renders difficult the reading of the H_2S production.

Escherichiae and *Klebsiellae*: Color of the medium red or yellow (acid) with great and rapid production of gas. Motility positive or negative. Indol generally impossible to observe.

Paracoli: Those lactose of sucrose positive give the same reaction as *Escherichia*. Those lactose or sucrose negatives give the same reactions as *Salmonellae*. Sometimes indol positive and H_2S negative.

Pseudomonas: Color of the medium unchanged. The slant tends to alkalinity. It is impossible to observe motility because there is no growth in the bottom.

Alkaligenes: Color of the medium unchanged. The slant tends to alkalinity.

The medium does not alter the antigenic properties of the strains and with the mass of organisms on the slant we can make the serologic diagnosis.

It is admitted that this medium is somewhat more laborious to prepare than others used for similar purposes. Nevertheless it can give informations generally obtained by two or three other media. Its use represents much saving in time, labor and material, and we suggest it for routine laboratory work in which a quick presumptive preliminary grouping of enteric organisms is needed.

BIBLIOGRAFIA

1. Krumwiede, J.C. Jr. & Kohn, L.A., 1917, A triple-sugar modification of the Russell double-sugar medium. *J. Med. Res.*, 37: 225-227.
2. Kligler, I.J., 1917, A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group. *Amer. J. Publ. Hlth.*, 7: 1042-1044.
3. Difco Manual, 1948, *Triple sugar iron agar*. 8th ed.
4. Singer, J., 1950, Culture of Enterobacteriaceae. I — A practical medium containing urea, tryptone, lactose and indicators. II — Use of urea triple sugar agar. *Amer. J. Clin. Path.*, 20: 880-885.
5. Rugai, E., Comunicação pessoal.
6. Surraco, N.L. & Pereyra, V.R., 1942, Nuevo medio de cultivo para el repicado de colonias en el aislamiento de Salmonelas y Shigelas. *Arch. Urug. Med. Cir. Espec.*, 21: 518-523.
7. Monteverde, J.J., 1948, Medio de cultivo semisolido con lactosa, urea y doble indicador para selecionar Salmonelas y Shigelas. *Sem. Med.*, B. Aires, 55: 846-848.
8. Zia, S.H., Chao, C.C. & Chin, C.H., 1951, Further studies on the semisolid multiple sugar medium. *Chin. Med. J.*, 69: 481-487.
9. Bader, R.E. & Hotz, G., 1951, Eisen-Harnstoff-Agar, eine Modifikation des Eisen-Agars nach Kligler. *Z. Hyg.*, 133: 20-25.
10. Archambault, J. & McCrady, M.E., 1942, Dissolved air as a source of error in fermentation tube results. *Amer. J. Publ. Hlth.*, 32: 1164-1168.
11. Solé Vernin, C., Observações não publicadas.
12. Pacheco, G. & Peres, J.N., 1939, Investigações sôbre a capacidade sulfurígena das bactérias. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 34: 527-546.
13. Suassuma, J., 1954, VIII Semana Brasileira de Debates Científicos, São Paulo.

Tipos fermentativos do bacilo tífico

Gobert Araujo Costa, Washington Augusto de Almeida e **Niber da Paz Moreira da Silva**
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D.F.

Em 1901, Jensen, estudando a ação do bacilo tífico sôbre os hidratos de carbono, demonstra uma diferença na capacidade fermentativa das amostras em presença de xilose e da arabinose. Após êste achado, inúmeros trabalhos apareceram confirmando o comportamento diferente das amostras de *Salmonella typhi*.

Kjer-Petersen & Bjornsson (1909) propõem uma divisão para o bacilo tífico em três tipos: O tipo I constituído por amostras que fermentam a xilose e não a arabinose; o tipo II que não fermenta a arabinose nem a xilose, e o tipo III que decompõe os dois açúcares.

Em 1926, Kristensen & Henriksen atentam para a importância de serem utilizados os tipos fermentativos do bacilo tífico nas investigações epidemiológicas. Mostram êles a estabilidade dos tipos, bem como a possibilidade do seu aproveitamento para se determinar a origem única ou múltipla de uma epidemia.

Em 1933, Hirzfeld, Amzel & Rosenberg, estudando 579 amostras de bacilo tífico isoladas na Polônia, verificam a estabilidade da fermentação da xilose e recomendam o seu emprêgo na rotina diagnóstica.

Posteriormente, Kristensen (1938), em detalhado estudo, volta a insistir na separação dos tipos e em seu aproveitamento nos estudos epidemiológicos. Estabelece êle três tipos bioquímicos bem definidos:

Tipo I — Xilose + Arabinose —
Tipo II — Xilose — Arabinose —
Tipo III — Xilose + Arabinose +

Mostra Kristensen, mais uma vez, a estabilidade dos 3 biotipos e, em conseqüência, o seu grande interêsse epidemiológico.

Olitzki e colaboradores (1945) estudam amostras de bacilo tífico isoladas na Palestina demonstrando a constância dos tipos bioquímicos e o seu valor epidemiológico associado à determinação dos fagótipos.

De Blasi & Buogo (1952) admitem haver ainda um tipo IV, fermentador apenas da arabinose e mais raro que os outros.

Não pretendemos rever aqui tôda a bibliografia sôbre o assunto; no entanto, é oportuno referir os achados recentes de Felix & Ander-

SON (1951) e de PAVLATOU & NICOLLE (1953), confirmando as verificações de KRISTENSEN e assinalando a existência de uma relação entre os lisotipos e os tipos bioquímicos.

No presente trabalho, foi investigada a freqüência da distribuição dos tipos epidemiológicos das amostras de bacilo tífico recebidas de várias cidades do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS DE TRABALHO

Foram examinadas 211 amostras recebidas de sete Estados da Federação (norte, centro e sul) e distribuídas de acôrdo com a Tabela I.

TABELA I

Distribuição topográfica das amostras de S. typhi estudadas

ESTADO	N.º	%
Distrito Federal	79	37,44
Rio de Janeiro	43	20,37
Pernambuco	34	16,11
Rio Grande do Sul	20	9,47
São Paulo	17	8,05
Minas Gerais	9	4,26
Pará	9	4,26
TOTAL	211	99,96

As amostras foram recebidas em meio de agar simples, passadas em placa, para verificação de sua pureza, e submetidas a um estudo bioquímico preliminar, seguido de provas sorológicas, que permitissem a sua identificação como *S. typhi*.

As fermentações de d-xilose e de l-arabinose foram feitas em tubos de cultura com tubinhos de Durhan. O meio usado foi a água peptonada a 1%, pH 7,2, com 1% do açúcar e 1% de indicador de Andrade. Foram empregados açúcares da Pfanstiehl Chemicals Co., que foram dissolvidos, a frio, no meio básico, distribuídos e tindalizados por três aquecimentos a 75ºC, por 1 hora, em dias sucessivos. A leitura da fermentação dos dois açúcares foi feita com 18 a 24 horas.

RESULTADOS

Das 211 culturas estudadas, 120 (56,8%) foram classificadas no tipo I, 90 (42,6%) no tipo II e apenas 1 (0,4%) no tipo III. Foi elevada a percentagem de culturas do tipo II, em comparação com o resultado de outros autores.

Verifica-se, analisando a Tabela II, que foram encontradas amostras do tipo I em tôda a área de estudo, sendo que as culturas recebidas dos Estados de Rio Grande do Sul e Pará pertenciam tôdas a êsse tipo. O maior contingente de amostras do tipo II (71,1%) foi originário do D. Federal e também a única cultura do tipo III veio da Capital da República.

TABELA II

Distribuição, segundo a origem e classificação bioquímica, das amostras de S. typhi

ESTADOS	TIPO DE FERMENTAÇÃO					
	I		II		III	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Distrito Federal	14	11,6	64	71,1	1	100,0
Rio de Janeiro	33	27,5	10	11,1		
Pernambuco	25	20,8	9	10,0		
Rio Grande do Sul	20	16,6				
São Paulo	16	13,3	1	1,1		
Minas Gerais	3	2,5	6	6,7		
Pará	9	7,5				
TOTAL	120	56,8	90	42,6	1	0,4

Analisando a Tabela III, verifica-se que o tipo fermentativo I foi o mais freqüentemente encontrado em 5 Estados, a saber: Rio de Janeiro, Pernambuco, Rio Grande do Sul, São Paulo e Pará; o tipo II foi predominante no D. Federal e em Minas Gerais.

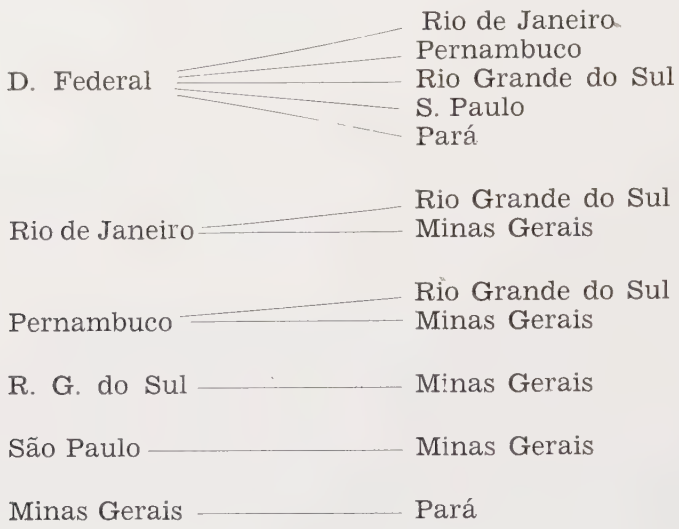
TABELA III

Distribuição por Estados dos tipos bioquímicos de S. typhi

TIPO DE FERMENTAÇÃO	DISTRITO FEDERAL		RIO DE JANEIRO		PERNAMBUCO		RIO GRANDE DO SUL		SÃO PAULO		MINAS GERAIS		PARÁ		Total
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	
I	14	17,7	33	76,7	25	73,5	20	100,0	16	94,1	3	33,3	9	100,0	120
II	64	81,0	10	23,2	9	26,4			1	5,8	6	66,6			90
III	1	1,2													1
TOTAL	79	99,9	43	99,9	34	99,9	20	100,0	17	99,9	9	99,9	9	100,0	211

Sendo diversa a incidência dos biotipos nas regiões consideradas, procuramos verificar se diferia significativamente o tipo de fermentação conforme o Estado ou zona estudada.

Foram significativas as diferenças de proporção, para os tipos I e II, entre os seguintes Estados:



Verifica-se, por êstes resultados, que as diferenças foram significativas tôdas as vêzes que, entre os Estados comparados, predominavam tipos de fermentação diferentes (I ou II): sòmente em dois casos, ou seja, confrontando o Estado do Rio de Janeiro com o Rio Grande do Sul e Pernambuco com Rio Grande do Sul, a diferença foi significativa entre Estados cujo tipo bioquímico predominante era o mesmo (I).

DISCUSSÃO

Deve-se a KRISTENSEN (1926) a importância dada aos tipos bioquímicos do bacilo tífico na pesquisa epidemiológica desta infecção. De início, era essencial estabelecer, se na realidade havia uma estabilidade dos tipos fermentativos, pois todo o acêrto da pesquisa epidemiológica dependia dêste fato. Não só pôde KRISTENSEN verificar a estabilidade dos biotipos como vários outros trabalhos mostraram ser perfeitamente constantes êstes tipos.

Com o uso rotineiro, preconizado por CRAIGIE & YEN (1938) e os que se lhes seguiram, da determinação dos tipos epidemiológicos por meio de fagos específicos Vi, a tipagem bioquímica ficou relegada a plano secundário, uma vez que maior precisão e mais variedades se obtêm com aquêle método. No entanto, alguns trabalhos recentes têm demonstrado o interêsse da aplicação, mesmo isolada, do método de Kristensen e a necessidade de se completar a tipagem pelos bacteriófagos, principalmente nos lisotipos heterogêneos, com a classificação bioquímica, obtendo-se, com isto, maior eficiência do trabalho (JUDE & NICOLLE (1949) e PAVLATOU & NICOLLE (1953).

No presente trabalho, nos preocupámos sòmente com a verificação dos tipos bioquímicos encontrados no Brasil. Foram êstes variados e a sua distribuição desigual. Se bem que o número de amostras estudadas não seja elevado, a análise estatística feita demonstrou haver diferenças significativas na incidência dos tipos de várias regiões.

Nos Estados onde há exclusividade de um tipo único, fácil será verificar a penetração de tipos exóticos e, com isto, localizar a origem da infecção. Nas cidades cosmopolitas, como o Rio de Janeiro, vários foram os tipos encontrados, inclusive o tipo III, que não foi achado em qualquer outra localidade.

Não pretendemos, naturalmente, reduzir as pesquisas epidemiológicas a simples verificações de tipo bioquímico pois a lisotipagem e a análise sorológica devem ser colocadas em primeiro plano. No entanto, em vista dos dados ora obtidos, é de todo recomendável que os laboratórios estaduais de Saúde Pública realizem sistemàticamente a pesquisa dos tipos bioquímicos para que se possa, em estudos posteriores, levantar as predominâncias regionais dos vários tipos de KRISTENSEN.

CONCLUSÕES

Os autores estudaram os tipos bioquímicos de 211 amostras de *S. typhi* isoladas em vários Estados do Brasil.

O tipo I foi o mais freqüente, não só em tôda a série, como em 5 Estados; o tipo II predominou em 2 Estados e sua percentagem foi relativamente alta.

Houve diferenças significativas, na proporção dos tipos I e II, entre vários Estados. Sempre que, entre as Unidades comparadas, predominavam tipos de fermentação diferentes (I ou II), as diferenças de proporção foram significativas.

É recomendável que se faça rotineiramente, nos laboratórios de Saúde Pública, a determinação dos tipos bioquímicos de KRISTENSEN a fim de se estabelecer a distribuição regional dos mesmos.

Agradecemos ao Prof. Mário Ramos e aos Drs. Dinarte Ribeiro, Augusto Taunay, Laurênio Costa e Germano Bretz a remessa das culturas de *S. typhi* isoladas nos vários Estados referidos no presente trabalho.

BIBLIOGRAFIA

DE BLASI, R. & BUOGO, H., 1952, citado por Pavlatou, M. & Nicolle, P. (1953).

CRAIGIE, J. & YEN, C.H., 1938, Notes of the typing of B. typhosus with Vi phage. *Canad. Publ. Hlth. J.*, 29: 448, 484.

FELIX, A. & ANDERSON, E.S., 1951, Bacteriophage, virulence and agglutination tests with a strain of *S. typhi* of low virulence. *J. Hyg.*, 49 (2-3): 349.

HIRZFELD, L., AMZEL, R. & ROSENBERG, J., 1933, Sur la differentiation de types biochimiques parmi les bacilles typhiques. *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 112: 1454-1456.

Jensen, C.O., 1901, citado por Kristensen, M. & Henriksen, H.C.D. (1926).

Jude, A. & Nicolle, P., 1949, Determination des types bactériophagiques et caractères biochimiques des souches de *S. typhi*. *Ann. Inst. Pasteur,* 77 (5): 550.

Kjer-Petersen & Bjornsson, K., 1909, citado por Kristensen, M. & Henriksen, H.C.D. (1926).

Kristensen, M., 1938, Studies on the type division of the typhoid and paratyphoid B bacilli by fermentation. *J. Hyg.,* 38 (6): 688.

Kristensen, M. & Henriksen, H.C.D., 1926, Reactions fermentatives du bacille typhique et leur rôle epidemiologique. *Comm. Inst. Serother. Danois,* 16:

Olitzki, L., Olitzki, A.L. & Shebusky, M. 1945, Types of *Eb. typhosa* in Palestine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.,* 39 (2): 167.

Pavlatou, M. & Nicolle, P., 1953, Incidente des types biochimiques parmi les types bactériophagiques de *Salmonella typhi*. *Ann. Inst. Pasteur,* 85 (2): 185-198.

Observations on the morphology of *Australorbis nigricans*

W. Lobato Paraense and **Newton Deslandes**
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D.F.
Serviço Especial de Saúde Pública, Rio de Janeiro, D.F.

(With 11 text-figures and 3 plates)

In a previous paper (Paraense & Deslandes, 1955) we published the results of our observations on the morphology of *Australorbis glabratus*, as a contribution to the systematics of that species. We will now present the results of a similar study dealing with another great planorbid from the neotropical region, *Australorbis nigricans* (Spix, 1827).

MATERIAL AND METHODS

On September, 1954, we collected 1 185 specimens of *A. nigricans* from a single breeding place in the city of Itajubá, southern State of Minas Gerais, Brazil, the shell diameter of which ranged from 5 to 27 mm. Identification was made on the basis of the shell characteristics, according to the descriptions and figures presented by Lutz (1918) under the name *Planorbis nigricans* Spix, 1827. In order to render the results of the present study directly comparable with those of our before mentioned observations on *A. glabratus*, we selected 50 specimens with 18 mm in shell diameter. The methods referred to in our previous paper were employed again in the present work.

SHELL

The freshly emptied shell was horny, translucent in all but the deeply dark specimens, covered with a slender epidermis, with a fine, more or less distinct, oblique striation corresponding to the growth lines, and had six whorls in every specimen.

The prevailing colour was a ferruginous sepia, there occurring a minority of ochreous, olivaceous, nigrescent, and deeply black specimens. Corroded shells were frequently found, showing white, sometimes broad areas (pl. 1, fig. 3) owing to nacre exposure.

This work was done through co-operation between the Instituto Oswaldo Cruz and the Serviço Especial de Saúde Pública, Brasil.

The right side was either flattened or deeply concave, all intermediate degrees occurring between those extremes, the depth from the last whorl to the bottom of the umbilicus ranging from 1.5 to 3.5 mm. A carina runs parallel to and closely below the suture line, becoming quite distinct at the last whorl as a ridge near the rounded periphery (pl. 1, figs. 1a, 2a, 4). The carina varies in sharpness from poorly developed to bluntly angular. Almost always it becomes indistinct before reaching the margin of the aperture, nevertheless arriving at that point in some specimens. Since the whorls gradually increase along each side of a sagittal plane, a given whorl overlaps its predecessor by both sides (pl. 1, fig. 9b). The last whorl, however, tends to deviate to the left, the right surface of it becoming even with that of the preceding whorl (pl. 1, figs. 1b, 5, 7, 8). If the deflection is stronger, the fore portion of the penultimate whorl projects beyond the level of the last one.

The left side is more hollow than the right side, its depth varying between 1.5 and 3.5 mm. It is more conspicuously carinated than the right side (pl. 1, figs. 1c, 2c). The keel normally reaches the margin of the aperture, although in some specimens it somewhat dims shortly before arriving at that point. The conspicuousness of the left keel is due to its being sharper and less near the suture than the right one.

The right carina describes a spiral whose radius of curvature increases more rapidly than that of the spiral described by the left carina. Consequently, the area bounded by the right spiral is broader than that bounded on the opposing side, in spite of both spirals having the same number of whorls.

The shell aperture has a deltoid outline in most cases (pl. 1, figs. 1b, 5, 7, 8). The right wall runs nearly parallel to the sagittal plane up to the level of the carina. At this point the wall bends toward the medial line and then slopes about 45° to reach the left carina. Here it turns at an obtuse angle and attaches to the suture line. The width (transverse diameter) of the aperture predominated over its height (dorsoventral diameter). The commonest variations of the aperture were the projection (pl. 1, fig. 8) and blunting (pl. 1, fig. 7) of the angle formed by the left carina, the inclination of the right wall to the right (pl. 1, fig. 6), the increasing (pl. 1, fig. 2b) and decreasing (pl. 1, figs. 6, 8) in the curvature of the dorsal wall, the depression of the right wall (pl. 1, fig. 2b), the increasing (pl. 1, fig. 6) and decreasing (pl. 1, fig. 2b) in the mouth width.

The width of the shell, taken in the region of the aperture, was 6.37 ± 0.29 mm. In the previously studied sample of *A. glabratus* it was 5.59 ± 0.24 mm. The extremes of width variation in the present sample are shown in pl. 1, figs. 1b and 2b. The relatively large width and the existence of a keel on both sides are the most remarkable shell characteristics of *A. nigricans*. A section through the plane corresponding to the greatest shell diameter (pl. 1, fig. 9b) shows that the

whorls are rather low, their width being about twice the height, and have the lateral angulations corresponding to the keels. A similar section through a shell of *A. glabratus* (pl. 1, fig. 9a) shows that the whorls are comparatively higher and less wide, and have smooth lateral walls.

ANIMAL

The body is similar in appearance to that of *A. glabratus*. Some remarkable differences, however, were found as to pigmentation and body length. Pigmentation is less intense in *nigricans*, so that the external details of the organs caudally situated are clearly discerned through the enveloping mantle. The body length was 60.26 ± 3.62 mm, whereas in *glabratus* it was 47.06 ± 3.31 mm. The difference between these means is highly significant statistically, thus indicating that, the shell diameters being equal, the body is longer in *nigricans*.

RENAL TUBE

This organ is longer than in *glabratus*, being 30.68 ± 1.69 mm in length and 1.55 ± 0.37 mm in width. The ureter was 2.56 ± 0.30 mm long.

The renal region is devoid of longitudinal ridge, looking smooth and unpigmented (fig. 1 *tr*). The lack of a ridge is decisive in distinguishing *nigricans* from *glabratus*. In some larger specimens of the former the renal region may look somewhat crinkled, but a careful examination shows that there actually exists no longitudinal ridge, the crinkling being due to fixation artefact. In the small specimens up to about 10 mm in diameter the renal region has no ridge in either species (pl. 2, fig. 1; pl. 3, fig. 1), but one can easily distinguish a pigmented line along the path of the future ridge in *glabratus*, whereas such line does not develop in *nigricans* (pl. 2, fig. 2; pl. 3, fig. 2).

Owing to pigment shortage, the medial margins of the renal and pulmonary veins may be seen by transparency through the renal tube.

Fig. 3, pl. 2, and fig. 3, pl. 3, show the histological features of the renal regions in *glabratus* and *nigricans* having 18 mm in shell diameter, the other characteristics of the region being similar in both species.

GENITALIA

The histological and nearly all the anatomical features resemble those of *glabratus*. The differences, when existing, will be mentioned in the following description.

HERMAPHRODITE ORGANS

Ovotestis — Length 14.48 ± 1.93 mm, greatest width 1.70 ± 0.23 mm at the cephalic end (figs. 2, 6 *ot*, 7), thus being longer than in *glabratus*.

Ovisperm duct — Length 13.04 ± 1.60 mm, width about 0.10 mm (fig. 6 *co*). The seminal vesicle was 0.97 ± 0.21 mm in greatest width (fig. 6 *vs*).

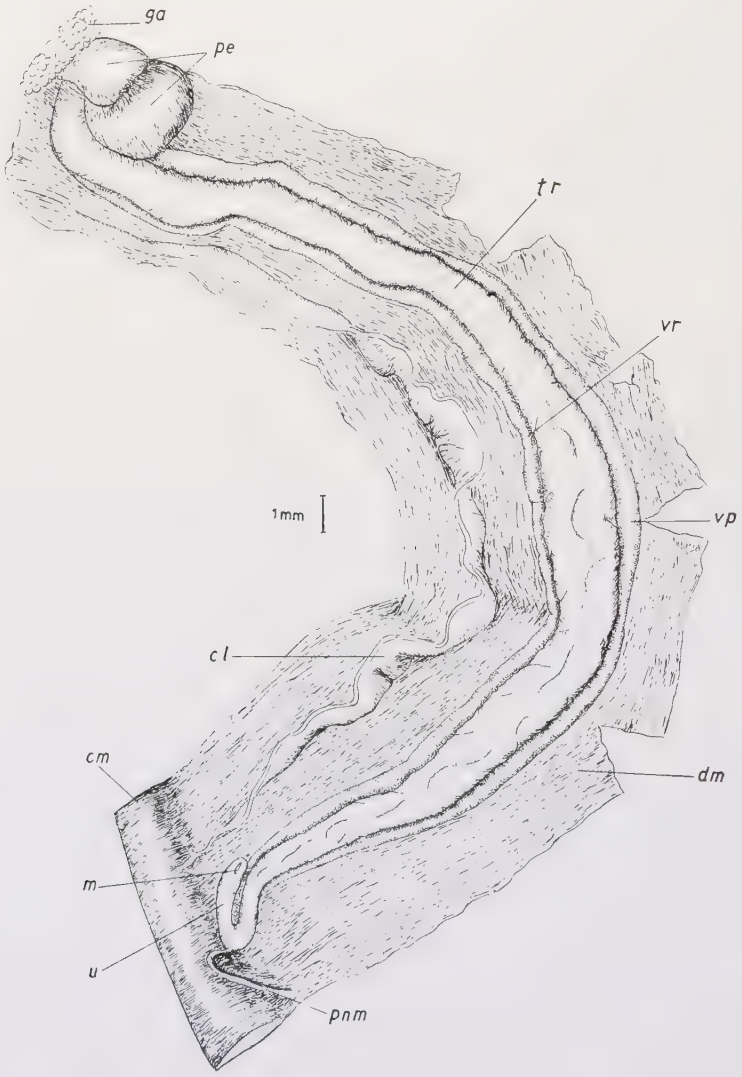


Fig. 1 — Ventral view of roof of respiratory cavity, showing smooth membrane covering renal tube. (cl = longitudinal lateral ridge; cm = mantle collar; dm = roof of respiratory cavity; ga = albumen gland; m = meatus of ureter; pe = pericardium, around heart; pnm = pneumostome; tr = renal tube; u = ureter; vp = pulmonary vein; vr = renal vein).

Carrefour — Resembling that of *glabratus* (fig. 6 *ca*).

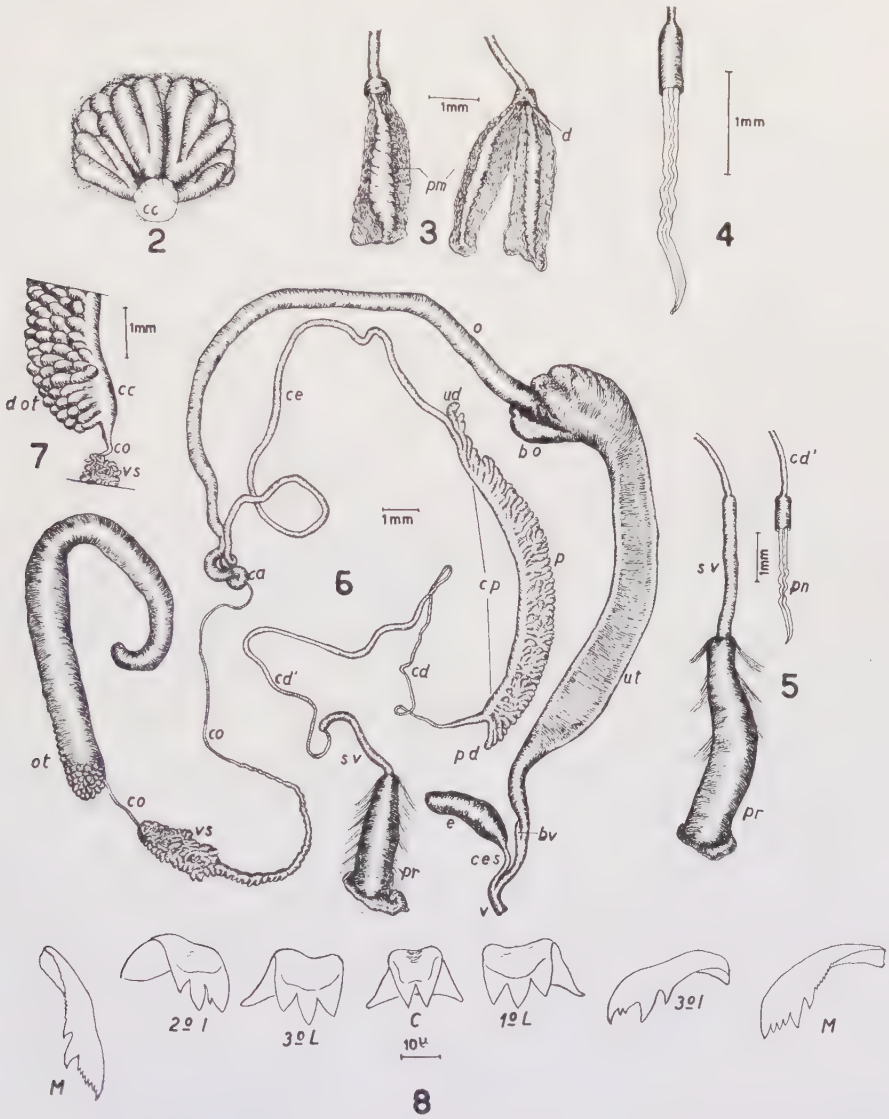


Fig. 2 — Arrangement of diverticula in cephalic half of ovotestis (diagrammatic); fig. 3 — preputium from within; fig. 4 — verge, showing apical outlet of sperm canal; fig. 5 — left: penial complex, right: verge within vergic sac partly removed; fig. 6 — whole genitalia dissected: ovotestis from dorsolateral side; fig. 7 — cephalic portion of ovotestis from left side; fig. 8 — radula teeth: central, lateral 1st and 3rd, intermediate 2nd and 3rd, marginal. (bo = pouch of the oviduct; bv = vaginal pouch; ca = carrefour; cc = collecting canal of ovotestis; cd = proximal segment of vas deferens; cd' = distal segment of vas deferens; ce = sperm duct; ces = spermathecal duct; co = ovisperm duct; cp = prostate duct; d = muscular diaphragm between vergic sac and preputium; dot = ovotestis diverticula; e = spermatheca; o = oviduct; ot = ovotestis; p = prostate; pd = foremost prostate diverticulum; pm = muscular pilaster in the wall of preputium; pn = verge; pr = preputium; sv = vergic sac; ud = hindermost prostate diverticulum; ut = uterus; v = vagina; vs = seminal vesicle).

MALE ORGANS

Sperm duct — Much longer than in *glabratus*, measuring 21.36 ± 1.53 mm in length and about 0.20 mm in width (fig. 6 *ce*).

Prostate — The prostate duct (fig. 6 *cp*) measured 7.14 ± 0.74 mm, thus being significantly longer than in *glabratus*, in which it measured 5.53 ± 0.74 mm (the difference between the means is 11 times its standard error).

The configuration of the diverticula did not differ from that described in *glabratus*. However, some differences were observed as to their number and disposition. The former ranged from 12 to 26, the mean being 19.6 ± 3.1 (in *glabratus* 15 to 30, mean 21.6 ± 3.5). The difference between the means is significant, thrice as great as its standard error. Therefore, the prostate of *nigricans* has fewer diverticula, in spite of showing a longer duct. This fact is due to the stalks of the diverticula tending to be more separate in *nigricans* (fig. 9).

The last diverticulum was simple in 8, bifurcate in 20, trifurcate in 2, arborescent in 20 cases. The penultimate one was simple in 3, bifurcate in 4, arborescent in 43 cases. The antepenultimate was ever arborescent, with the exception of one club-shaped anomaly. The first diverticulum was simple in 5, bifurcate in 1, arborescent in 44 cases. The intermediate were all arborescent; exceptionally a club-shaped or nodular intermediate diverticulum may occur. The aspects referred to are shown in figs. 9, 10, 11.

The prostate of *nigricans* tends to be more branched than that of *glabratus*, as may be seen if one compares the caudal diverticula of both species. In an average prostate of *glabratus* the last diverticulum is either simple or bifurcate, the penultimate one is arborescent, bifurcate or simple, the remaining ones are arborescent. In *nigricans* the last diverticulum is usually bifurcate or arborescent, the remaining ones being arborescent.

Vas deferens — Length 20.68 ± 1.38 mm, width about 0.15 mm (fig. 6 *cd, cd'*), being longer than in *glabratus*. The ratio *vas deferens/ vergic sac* was 6.8 ± 0.8 (in *glabratus* 4.7 ± 0.6). The difference between these means is highly significant, 14 times its standard error. If this difference is confirmed in other samples, it will be useful as another distinguishing attribute.

Penial complex — The *verge* (figs. 4, 5 *pn*) was 3.08 ± 0.28 mm long and 0.11 ± 0.02 mm wide. In 40 of the 50 specimens examined the verge measured 3 mm.

The *vergic sac* (figs. 5, 6 *sv*) was 3.07 ± 0.28 mm long and about 0.20 mm wide.

The verge and vergic sac were longer in *glabratus*, in spite of the other organs being shorter in this species.

The ratio *vergic sac/preputium* was 0.84 ± 0.12.

The *preputium* (figs. 3, 5, 6 *pr*) was 3.69 ± 0.47 mm long and 0.85 ± 0.10 mm wide.

FEMALE ORGANS

Albumen gland — Resembling that of *glabratus* (fig. 1 *ga*).

Oviduct — Length 16.26 ± 1.41 mm, width 0.59 ± 0.11 mm (fig. 6 *o*), thus being longer and narrower than in *glabratus* (10.24 ± 1.29 and 0.81 ± 0.16 mm). The pouch at the cephalic end measured 1.85 ± 0.28 mm in greatest width (fig. 6 *bo*), whereas in *glabratus* it was 2.34 ± 0.39 mm.

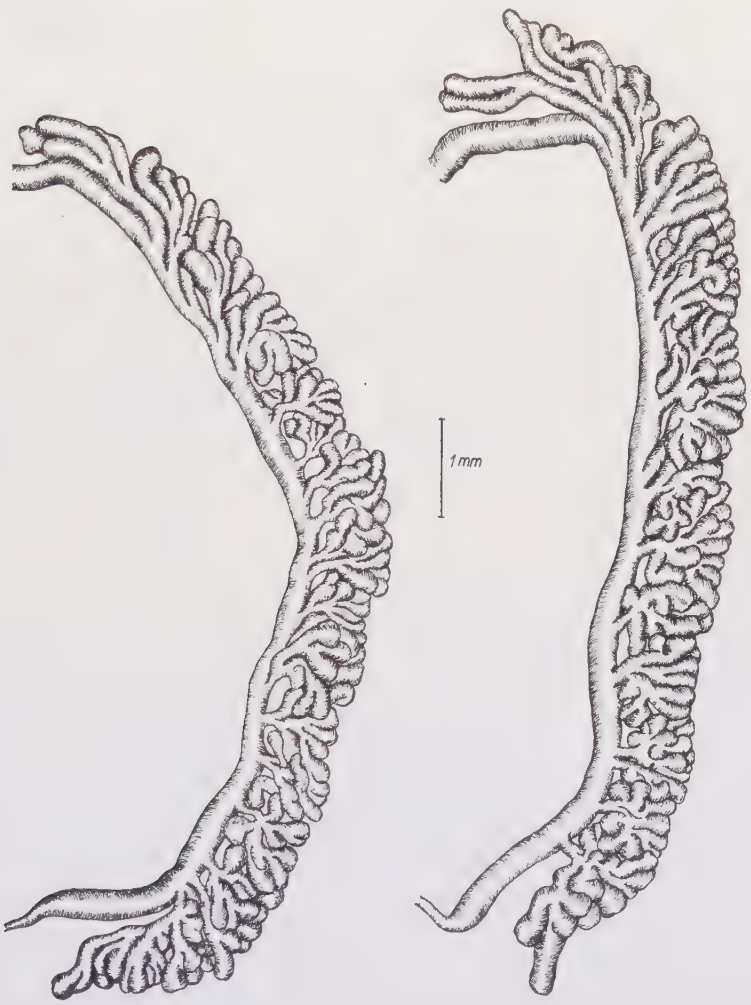


Fig. 9 — Prostates from two specimens, Left, with hindermost diverticulum arborescent. Right, with hindermost diverticulum bifurcate.

Uterus — Length 13.24 ± 1.19 mm, greatest width 1.52 ± 0.28 mm (fig. 6 *ut*), being also longer and narrower than in *glabratus* (10.58 ± 1.18 and 1.84 ± 0.32 mm).

Vagina — Length 1.70 ± 0.22 mm, width 0.28 ± 0.05 mm (fig. 6 *v*). The vagina of *nigricans*, as well as the verge, was shorter than in *glabratus* (2.06 ± 0.15 mm). At the level of its caudal swelling (vaginal pouch, fig. 6 *bv*) the organ measured 0.39 ± 0.07 mm in greatest width.

Spermatheca — Length 2.78 ± 0.40 mm, width 0.86 ± 0.16 mm (fig. 6 *e*), being about 1.5 times as long as in *glabratus* (1.57 ± 0.41 mm). The spermathecal duct was 1.11 ± 0.20 mm long and 0.10-0.15 mm wide (fig. 6 *ces*).

RADULA

Six out of the 50 specimens examined showed anomalous either central or lateral teeth. As it happens in such cases, a given anomaly reproduced along the whole vertical row of teeth in which it occurred.

The number of teeth rows varied from 125 to 168 (mean 153.9 ± 8.4). The radula formula ranged from 28-1-28 to 36-1-36 (mean 31.8 ± 1.9). The modal formula was 31-1-31.

The teeth resembled those of *glabratus*. Some aspects of them are shown in fig. 8.

DISCUSSION

At the outset of our investigations on the Brazilian *Planorbidae*, we admit true that all populations of carinate, wide-shelled specimens occurring in this country belong to the species *A. nigricans*. The original conchological literature on the subject being decidedly confusing and inconclusive, we consider as a waste of time and oftenest improductive mental exertion any attempt to judge the fitness of the earlier descriptions intended to institute a diversity of species within that group. If one examines a moderately large sample from a colonial population, it will become clear that at least some of the so-called species fall within the range of individual variation of the population. Therefore, intensive and extensive investigations are needed in order to ascertain the real status of such species. As a working hypothesis, we consider *A. nigricans*, as well as *A. glabratus*, to be polymorphic species (the polymorphism being either adaptive or nonadaptive), based on the fact that the populations which occupy many habitats in their territory of distribution should be genetically more diversified than populations restricted or specialized for occupation of only few habitats (Dobzhansky, 1953, p. 133).

The description just presented shows that *nigricans* and *glabratus* are closely related species from a morphological standpoint. However,

the ridge and melanic pigmentation along the ventral surface of the renal tube, that we have consistently observed to occur in *glabratus* and to be lacking in *nigricans*, and on a second plane the width and carination of the shell, give support to considering the latter a good species from a taxonomic standpoint (morphospecies).

Fig. 10 — Isolated diverticula from prostate fig. 9 at right.

The shell width exhibits a range of variation in both species, there occurring wide-shelled populations of *glabratus*, as well as narrow-shelled specimens of *nigricans*. The carination is almost always clearly distinct in *nigricans*, even in the narrowest specimens, whereas the whorls are laterally smooth in *glabratus*. In doubtful cases the character of the renal region has till now proved a sure means of differentiation.

As doubtful cases we particularly refer to the specimens of some populations of *nigricans* which do not conform to the usual conchological pattern, showing a nearly indistinct carination resulting in an appearance that in many specimens may be mistaken for that of

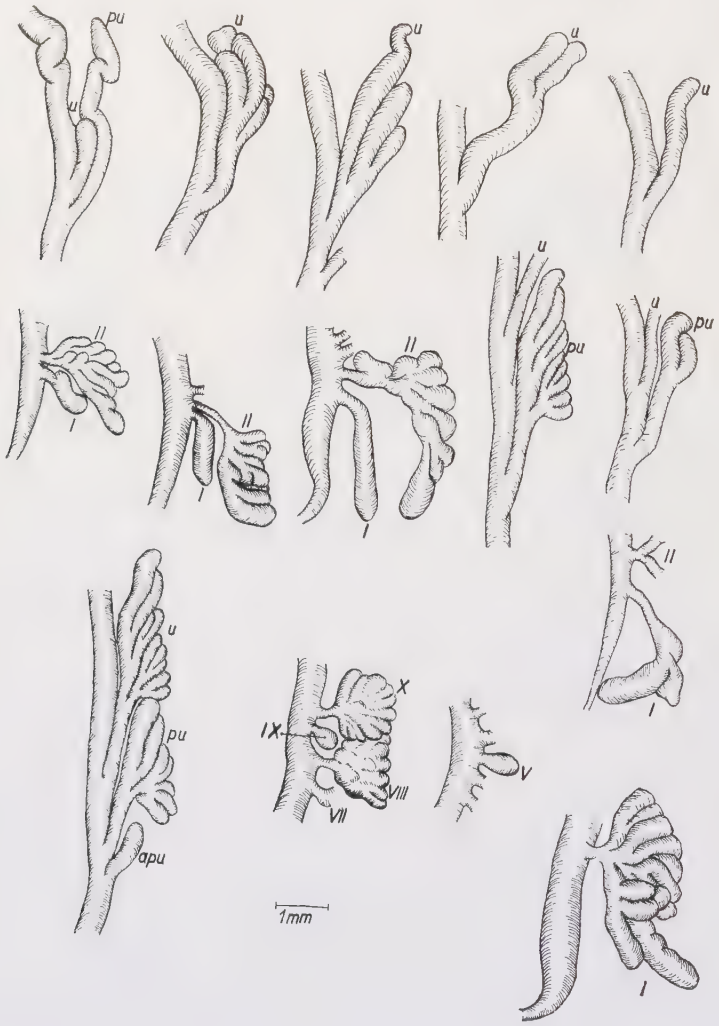


Fig. 11 — Variation in prostate diverticula (u = hindermost; pu = penultimate; apu = antepenultimate).

glabratus. We have met with such populations, in addition to other biotopes, in Jacarepaguá (Distrito Federal) and in Saboó (a district of Santos city).

The great morphological resemblance, indicating a close relationship, between the species *nigricans* and *glabratus*, denotes that they either diverged from a common ancestor, or derived from one another.

A previous knowledge that we are far from attaining to is needed on the spatial distribution of both species, and chiefly on their vertical distribution along the geologic strata.

We do not certainly know whether both species may occur sympatrically, in spite of this fact having been mentioned by Spix (1827). If sympatry actually occurs, it will be needful to verify whether it is ancient or recent, in which regions it is observed, and whether the two species hybridize in those regions.

SUMMARY

A morphological study was done on *A. nigricans,* based on the observation of shell, radula, renal region and genitalia of 50 specimens measuring 18 mm in diameter. The data obtained are to be compared with those recorded in our previous paper (Paraense & Deslandes, 1955) on *A. glabratus*. The characteristics common to both species will not be mentioned here. The numerals refer to the means and their standard deviations; no special reference being done, they correspond to length measurements.

Shell — 18 mm in diameter, 6.37 ± 0.29 mm in greatest width, 6 whorls. Prevailing colour ferruginous sepia, a minority of olivaceous, ochreous, nigrescent and deeply black specimens being found. Right side variously depressed, umbilicated, 1.5 to 3.5 mm deep from the bottom of the umbilicus to the highest level of the last whorl. Left side more depressed than the right one, broadly concave, 1.5 to 3.5 mm deep. Both sides show a variously distinct keel, that looks sharper at the left. Aperture deltoid, varying in outline and width.

Body, extended — 60.26 ± 3.62 mm, less pigmented than in *glabratus*.

Renal tube — 30.68 ± 1.69 mm, showing neither ridge nor pigmented line along its ventral surface, this negative character affording a sure means of separation from *glabratus*.

Ovotestis — 14.48 ± 1.93 mm.

Ovisperm duct — 13.04 ± 1.60 mm, including the non-unwound seminal vesicle. The latter was 0.97 ± 0.21 mm in greatest width.

Carrefour — Resembling that of *glabratus*.

Sperm duct — 21.36 ± 1.53 mm.

Prostate — Prostate duct 7.14 ± 0.74 mm, collecting a row of long diverticula numbering 19.6 ± 3.1 and more separate than in *glabratus*. Last diverticulum generally bifurcate or arborescent, the remaining ones arborescent.

Vas deferens — 28.68 ± 1.38 mm. Ratio vas deferens/vergic sac = 6.8±0.8.

Verge — 3.08 ± 0.28 mm long, 0.11 ± 0.02 mm wide.

Vergic sac — 3.07 ± 0.28 mm long, about 0.20 mm wide. Ratio *vergic sac/preputium* = 0.84 ± 0.12.

Preputium — 3.69 ± 0.47 mm long, 0.85 ± 0.10 mm wide.

Albumen gland — Resembling that of *glabratus*.

Oviduct — 16.26 ± 1.41 mm, swollen at the cephalic end.

Uterus — 13.24 ± 1.19 mm.

Vagina — 1.70 ± 0.22 mm, swollen at the caudal portion.

Spermatheca — 2.78 ± 0.40 mm long, 0.86 ± 0.16 mm wide. Spermathecal duct 1.11 ± 0.20 mm.

Radula — 125 to 168 horizontal rows of teeth (mean 153.9 ± 8.4). Radula formula 28-1-28 to 36-1-36 (mean 31.8 ± 1.9). Mode formula 31-1-31.

The morphological characteristics of the renal region and shell, and the great body length in the same condition of shell diameter, distinguish *A. nigricans* from the most related species *A. glabratus*, giving support to considering it a good species from a taxonomic or phenotypic standpoint (morphospecies).

RESUMO

Foi feito um estudo morfológico do *Australorbis nigricans*, baseado na observação da concha, da rádula, da região renal e da genitália de 50 espécimes com 18 mm de diâmetro. Os dados apresentados a seguir devem ser confrontados com os obtidos, nas mesmas condições, de uma amostra de *A. glabratus* e que constam de trabalho anterior (Paraense & Deslandes, 1955). Não serão referidos os caracteres comuns às duas espécies. Os números exprimem as médias e seus desvios padrões; quando não acompanhados de referência especial, correspondem a medidas de comprimento.

Concha — 18 mm de diâmetro, 6,37 ± 0,29 mm de largura máxima, 6 giros. Côr sépia tendendo a ferrugínea, podendo ser ocrácea, olivácea, nigrescente e intensamente negra. Face direita deprimida, umbilicada, com 1,5 a 3,5 mm do fundo do umbigo ao nível mais alto do último giro. Face esquerda mais deprimida que a direita, amplamente côncava, com 1,5 a 3,5 mm de profundidade. Cada face é percorrida por uma carena, de nitidez variável, a esquerda mais saliente. Abertura deltóide, com variações na conformação e na amplitude.

Corpo distendido — 60,26 ± 3,62 mm, relativamente pouco pigmentado.

Tubo renal — 30,68 ± 1,69 mm, sem crista nem linha pigmentar ao longo da face ventral; êste carater negativo permite separar *nigricans* de *glabratus*.

Ovoteste — 14,48 ± 1,93 mm.

Canal ovispermático — 13,04 ± 1,60 mm, incluindo a vesícula seminal enovelada. Vesícula seminal 0,97 ± 0,21 mm de largura máxima.

Carrefour — Semelhante ao do *A. glabratus*.

Canal espermático — 21,36 ± 1,53 mm.

Próstata — Canal prostático 7,14 ± 0,74 mm, recebendo uma fileira de divertículos longos, em número de 19,6 ± 3,1 e implantados em pontos mais afastados que no *glabratus*. Em geral, o último divertículo é bifurcado ou arborescente e os restantes são arborescentes.

Canal deferente — 28,68 ± 1,38 mm. Relação *canal deferente/saco vérgico* igual a 6,8 ± 0,8.

Pênis — 3,08 ± 0,28 mm de comprimento e 0,11 ± 0,02 de diymetro.

Saco vérgico — 3,07 ± 0,28 mm de comprimento, cêrca de 0,20 mm de largura. Relação *saco vérgico/prepúcio* igual a 0,84 ± 0,12.

Prepúcio — 3,69 ± 0,47 mm de comprimento e 0,85 ± 0,10 mm de largura.

Glândula do albúmen — Semelhante à do *glabratus*.

Oviduto — 16,26 ± 1,41 mm, com dilatação em forma de bôlsa na extremidade cefálica.

Útero — 13,24 ± 1,19 mm.

Vagina — 1,70 ± 0,22 mm, com dilatação em forma de bôlsa na porção caudal.

Espermateca — 2,78 ± 0,40 mm de comprimento e 0,86 ± 0,16 mm de largura. Canal da espermateca 1,11 ± 0,20 mm.

Rádula — 125 a 168 filas horizontais de dentes (média 153,9 ± 8,4). Fórmula radular 28-1-28 a 36-1-36 (média 31,8 ± 1,9). Fórmula modal 31-1-31.

Os caracteres morfológicos da região renal e da concha, e o maior comprimento do corpo em condições idênticas de diâmetro da concha, distinguem o *A. nigricans* da espécie mais próxima *A. glabratus*, permitindo considerá-lo como boa espécie do ponto de vista taxionômico ou fenotípico (morfoespécie).

REFERÊNCIAS

DOBZHANSKY, Th., 1953, *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press.

LUTZ, A., 1918, Caramujos de agua doce do gênero Planorbis no Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 10 (1): 65-82.

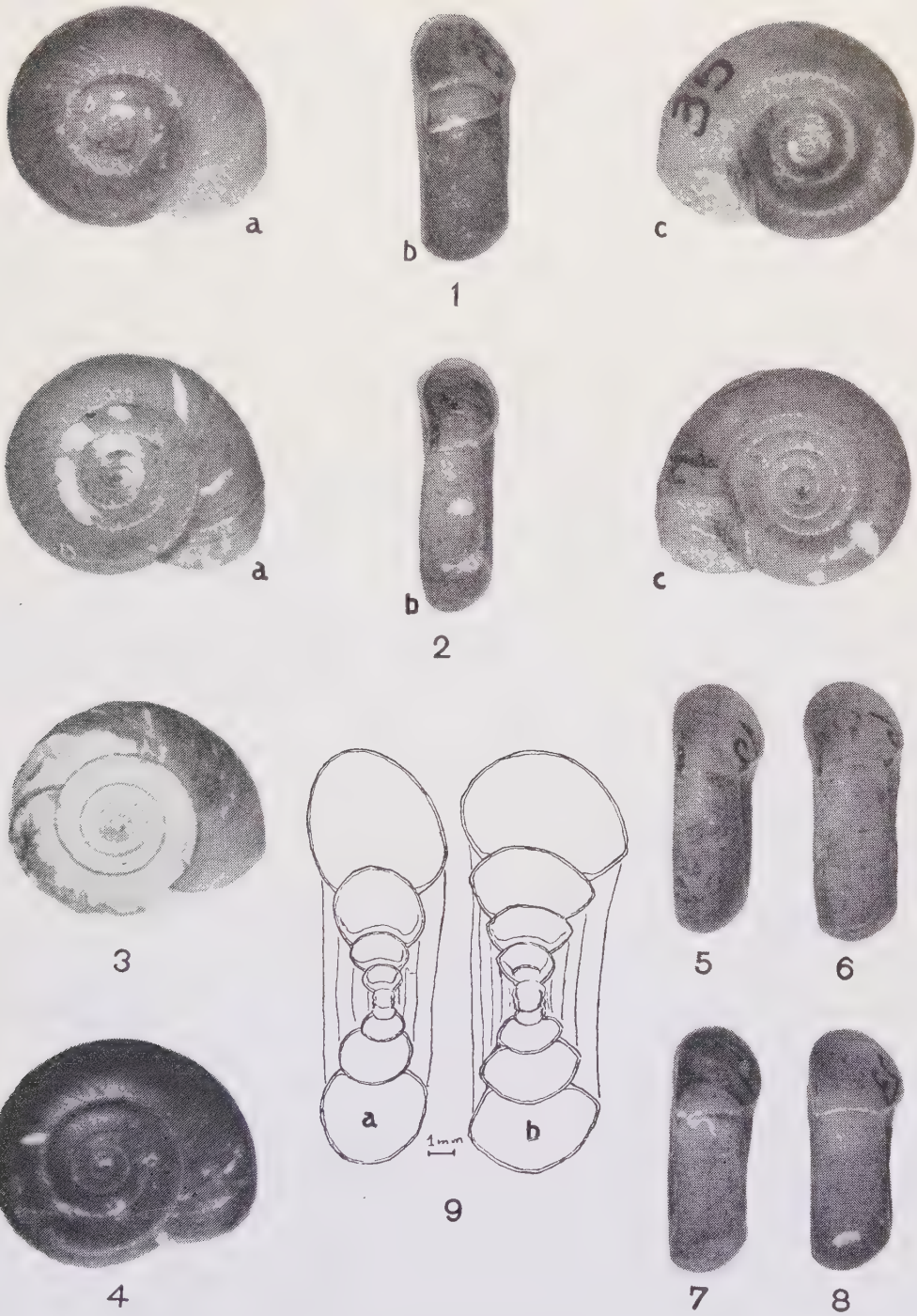
PARAENSE, W.L. & DESLANDES, N., 1955, Observações sôbre a morfologia do *Australorbis glabratus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 53 (1): 87-104.

SPIX, J.B. & WAGNER, J.A., 1827, *Testacea Fluviatilia Brasiliensia*. vi + 36 pp., 29 Tab., Typ. C. Wolf, Monachii.

PLATE 1

Figs. 1, 2 — Widest (1) and narrowest (2) shells from the sample studied, a = right side, b = front, c = left side (2x); fig. 3 — corroded shell (2x); fig. 4 — black shell (2x); figs. 5, 6, 7, 8 — shells from front (2x); fig. 9 — section through shells of *A. glabratus* (a) and *A. nigricans* (b).

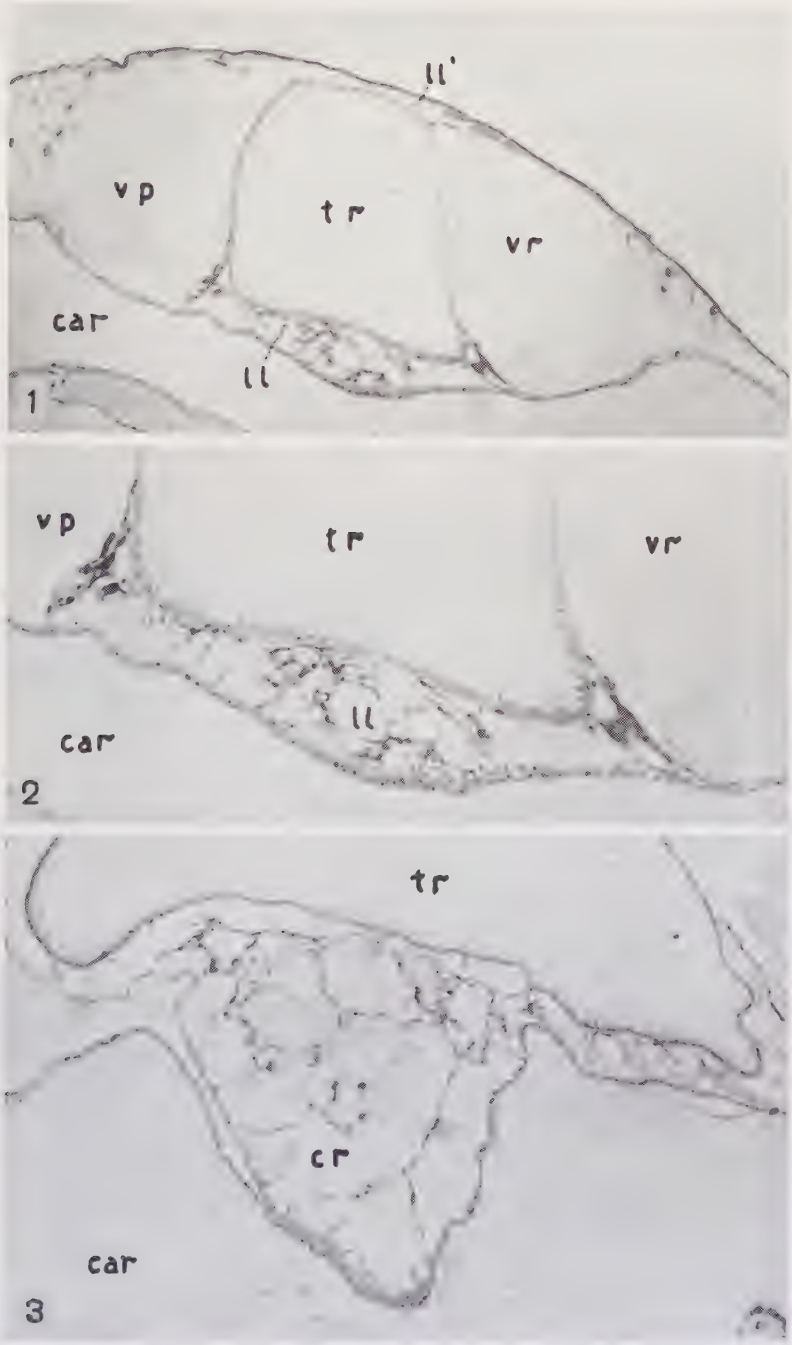
PLATE 1



Paraense & Deslandes: Morphology of Australorbis nigricans

PLATE 2

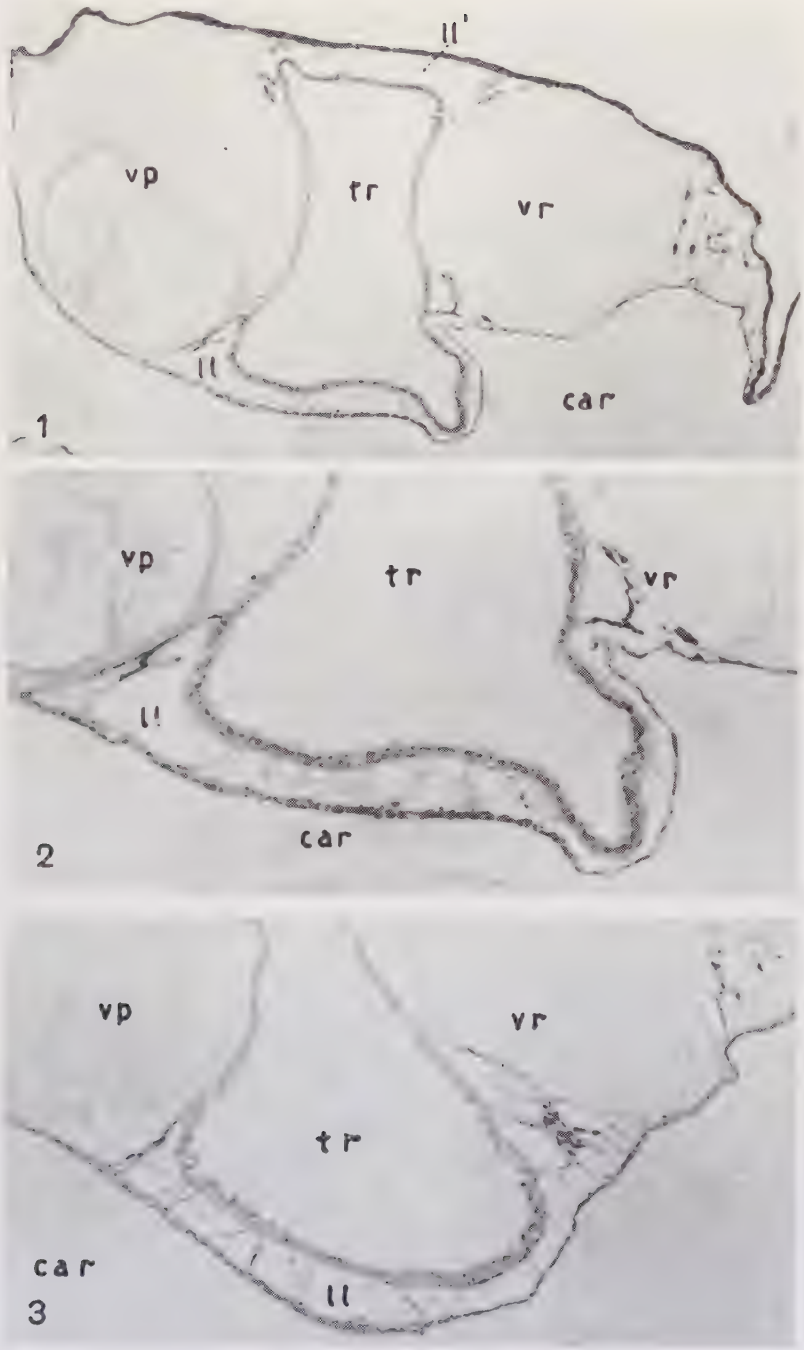
Fig. 1 — Cross section through middle of renal tube of *A. glabratus* 10 mm in diameter: no renal ridge, pigment in cells of lacunar reticulum (100x); fig. 2 — idem (200x)); fig. 3 — idem, *A. glabratus* 18 mm in diameter: renal ridge, pigment in cells of lacunar reticulum (100x). (car = respiratory cavity; cr = canal ridge; ll = layer of lacunar tissue between renal tube and ventral epithelium of dorsal membrane of mantle; ll' = layer of lacunar tissue between renal tube and dorsal epithelium of dorsal membrane of mantle; tr = renal tube; vp = pulmonary vein; vr = renal vein).



Paraense & Deslandes: Morphology of Australorbis nigricans

PLATE 3

Fig. 1 — Cross section through middle of renal tube of *A. nigricans* 10 mm in diameter: no renal ridge, very scarce pigment granules (100x); fig. 2 — idem (200x); fig. 3 — idem, *A. nigricans* 18 mm in diameter: no renal ridge, very scarce pigment granules (100x). (car = respiratoy cavity; cr = renal ridge; ll = layer of lacunar tissue between renal tube and ventral epithelium of dorsal membrane of mantle; ll' = layer of lacunar tissue between renal tube and dorsal epithelium of dorsal membrane of mantle; tr = renal tube; vp = pulmonary veins; vr = renal vein).



Paraense & Deslandes: Morphology of Australorbis nigricans

Espécies de *Zelurus* Hahn e *Opisthacidius* Berg de Colômbia, Ecuador e Peru (*Reduviidae, Hemiptera*)

Herman Lent
Instituto Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro, Brasil

e

Petr Wygodzinsky
Instituto Miguel Lillo,
Tucumán, Argentina

(Com 12 figuras no texto)

Na Colômbia se encontram referidas 11 espécies, tôdas do gênero *Zelurus*: 3 antes da revisão de Costa Lima (1940), a saber: *Zelurus bipustulatus* (Walker, 1873); *Z. formosus* (Stal, 1872); e *Z. spinidorsis* (Gray, 1832). Seis foram assinaladas ou descritas por nós (Lent & Wygodzinsky, 1951a; 1951b): *Zelurus beieri* Lent & Wygod., 1951; *Z. circumcinctus* (Hahn, 1835); *Z. luctuosus* (C. Lima, 1940); *Z. malaisei* Lent & Wygod., 1951; *Z. nigripennis* (Stal, 1872); e *Z. falsobscurus* Lent & Wygod., 1951. Finalmente, duas descritas recentemente por Hussey: *Zelurus gaigei* Hussey, 1953; e *Z. multicinctus* Hussey, 1953.

Neste trabalho adicionamos, para a Colômbia, outras duas espécies novas.

No Ecuador são 9 as espécies assinaladas até o presente, 7 conhecidas antes da monografia de Costa Lima (1940): *Zelurus audax* (Breddin, 1901); *Z. circumcinctus* (Hahn, 1835); *Z. fugax* (Breddin, 1903); *Z nugax* (Breddin, 1903); *Z. petax* (Breddin, 1901); *Z. tenax* (Breddin, 1901); *Z. vorax* (Breddin, 1903); e duas que assinalamos e descrevemos (Lent & Wygodzinsky, 1947b; 1947c): *Opisthacidius pertinax* (Breddin, 1903) e *Zelurus saileri* Lent & Wygod., 1947.

Agora, mencionamos duas outras espécies, uma das quais nova.

Para o Peru, a literatura registra 6 espécies, duas delas conhecidas de há muito: *Zelurus festivus* (Stal, 1859), referida como *Spiniger maculatus* por Signoret, em 1862; e *Zelurus circumcinctus* (Hahn, 1835), assinalada por Fracker & Bruner (1924). As 4 restantes foram indicadas por Lent & Wygodzinsky (1947b; 1951a; 1951c) e são: *Zelurus mordax* (Breddin, 1903); *Z. nigripennis* (Stal, 1872); *Z. petrobius* Lent & Wygod., 1951; e *Z. weyrauchi* Lent & Wygod., 1951.

Agora adicionamos uma nova espécie.

Zelurus breddini sp. n.

(Figs. 1, 5 e 6)

Fêmea — Comprimento total (até o ápice dos hemi-élitros) 16,5 mm; largura máxima — (ao nível do pronoto, na base dos processos humerais) 3 mm, (ao nível do abdômen) 5 mm.

De colorido amarelo-alaranjado: abdômen (face ventral) em tôda a extensão, esterno e pleuras, face inferior e laterais da cabeça, coxas, anel incompleto no 1/3 distal dos fêmures I e II; processos discais do lóbulo anterior do pronoto (exclusive o ápice) e região discal vizinha ao ponto de implantação; 1 + 1 manchas grandes no lóbulo posterior do pronoto; processo apical do escutelo (exclusive o ápice) e região onde se implanta, inclusive parte das cristas laterais limitantes da depressão central do escutelo; sutura claval nos 3/4 distais; e 1 + 1 manchas subapicais do cório dos hemi-élitros, transversais, a margem anterior sendo reta e a posterior acompanhando a implantação da membrana. De colorido prêto, as demais partes.

Cabeça conforme figs. 5 e 6, com pêlos erectos e longos esparsos, pouco numerosos, só mais aparentes na região ante-ocular. Distância interocular dorsal maior cêrca de 3/4 do que a largura de um ôlho, neste aspecto. Olhos globosos, bem desenvolvidos e, quando vistos de perfil, atingindo a face dorsal da cabeça, mas terminando distante da face inferior. *Jugae* e *genae* deitados, de ponta arredondada. Primeiro artículo antenal medindo 1,5 mm de comprimento e o 2.º com 4 mm. Rostro conforme fig. 6.

Pronoto com lóbulo anterior pouco convexo, sem espinhos laterais e 1 + 1 processos discais longos, bem desenvolvidos, erectos, quase de igual tamanho do processo escutelar; lóbulo posterior rugoso e ângulos póstero-laterais com processos humerais afilados e fortes, menores do que os discais; ângulos ântero-laterais do colarinho de ponta romba, grossos. Existem pêlos finos e longos, erectos, no lóbulo anterior e nos bordos pleurais do pronoto.

Saliências prosternais desenvolvidas. Escutelo com processo apical vertical, levemente maior do que os discais.

Patas com pilosidade abundante. Fêmures dos 1.º e 2.º pares com dupla fileira de dentículos de dois tamanhos em tôda a extensão da face inferior. Tíbias dessas patas serrilhadas na face inferior; fóssula esponjosa, que tem 1/5 do comprimento total das tíbias no 1.º par e 1/6 no 2.º par.

Hemi-élitros ultrapassando o ápice do abdômen em 1,2 mm, com as nervuras sem destaque ou relêvo.

Abdômen sem dentículos laterais, com a face ventral pilosa e a carena longitudinal presente nos 2.º e parte do 3.º segmentos e interrompida para surgir novamente no 7.º segmento.

Material examinado — Fêmea holótipo, Colombia, Neu Granada, Nolken, 1873 (no Museu de Viena).

A espécie se assemelha a *Zelurus bipustulatus* (Walker, 1873), cuja descrição original bem a caracteriza.

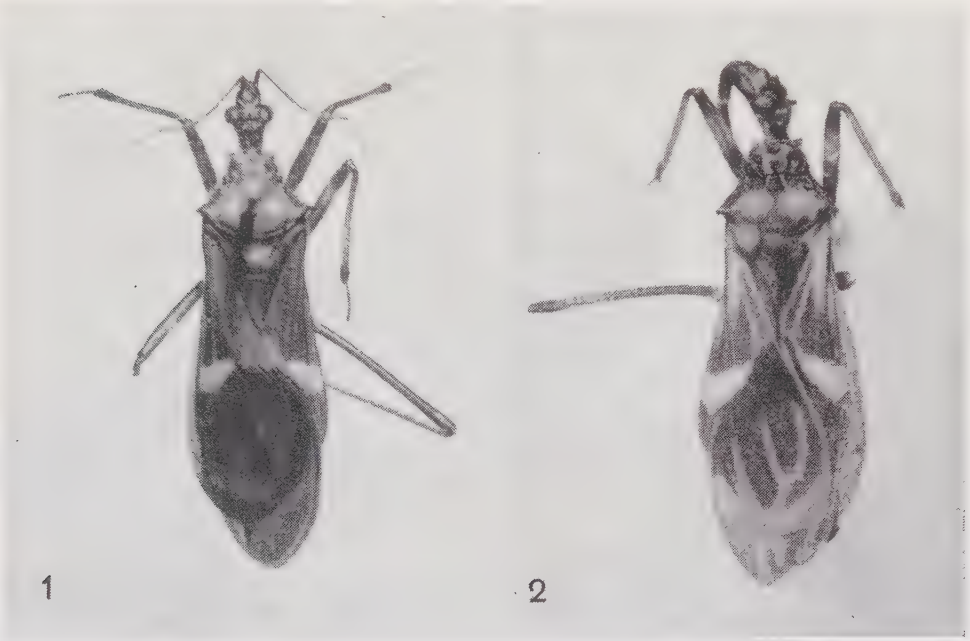


Fig. 1 — *Zelurus treddini* sp. n., macho holótipo; fig. 2 — *Zelurus burmeisteri* sp. n., fêmea holótipo.

Zelurus burmeisteri sp. n.

(Figs. 2, 7 e 8)

Fêmea — Comprimento total (até o ápice dos hemi-élitros) 15 mm; largura máxima — (ao nível do pronoto, sem os espinhos humerais) 3 mm , (ao nível do abdômen) 4 mm.

De colorido amarelo-alaranjado: abdômen (face ventral) em tôda a extensão; acetabula; pequena mancha na mesopleura no limite com a metapleura; na cabeça, lateralmente atrás dos olhos, em 1 + 1 manchinhas ao lado do bordo interno dos olhos e no ápice das *genas;* nos fêmures das 3 patas, em forma de anel ocupando parte do 1/3 mediano e parte do 1 3 apical; nas tíbias, com exceção de estreito anel apical; no pronoto, nos processos discais e humerais, excetuados os ápices e em 1 + 1 manchas centrais do lóbulo posterior; no processo apical do escutelo; no 1/3 basal do clavo e na sutura claval, na 1/2 basal do

cório difusamente e em forma de mancha regular subapical no cório, acompanhando parte da implantação da membrana; parte das nervuras do cório e quase tôdas as da membrana, além do ápice desta. De colorido prêto: as demais partes.

Cabeça conforme figs. 7 e 8, com poucos pêlos. Distância inter-ocular dorsal igual ao dôbro da largura de um ôlho neste aspecto. Olhos globosos, não muito volumosos, de perfil afastados das duas faces da cabeça, mais da ventral do que da dorsal. *Jugae* um pouco levantadas, subagudas. *Genae* de ponta arredondada.

Pronoto com lóbulo anterior pouco convexo, sem espinhos laterais e 1 + 1 processos discais longos, bem desenvolvidos (rompidos); lóbulo posterior rugoso e ângulos póstero-laterais com processos humerais afilados e fortes, porém menores do que os discais; ângulos ântero-laterais do colarinho de ponta romba.

Saliências prosternais desenvolvidas. Escutelo com processo apical vertical, com aspecto de ser idêntico ao dos discais (está rompido).

Patas pilosas, os fêmures dos 1.º e 2.º pares com dupla fileira de dentículos de 2 tamanhos em tôda a extensão da face inferior. Tíbias serrilhadas na face inferior; fóssula esponjosa pequena, com 1/5 do comprimento total na tíbia anterior e 1/7 na mediana.

Hemi-élitros ultrapassando em 1 mm o ápice do abdômen.

Abdômen sem dentículos laterais, a carena longitudinal ventral presente nos 2.º e parte do 3.º segmentos e interrompida para surgir novamente no 7.º segmento.

Material examinado — Fêmea holótipo, Colombia, Coll. C. F. Baker (no U. S. National Museum).

Zelurus petrobius Lent & Wygodzinsky, 1951

Material examinado — ? exemplar sem abdômen, Ecuador, Valley of R. Zamora, 900 m, Prof. C. Carrión, B. M. 1928-69, Spiniger sp. (no British Museum).

Zelurus camposi sp. n.

(Figs. 3, 9 e 10)

Macho — Comprimento total (até o ápice dos hemi-élitros) 15 mm; largura máxima — (ao nível do tórax) 3,5 mm, (ao nível do abdômen) 4,2 mm.

Colorido geral prêto com manchas vermelhas isoladas no cório dos hemi-élitros, uma sub-basal alongada longitudinalmente e outra sub-apical transversal.

Cabeça conforme figs. 9 e 10, com cerdas finas e longas, mais numerosas na região ante-ocular. Distância inter-ocular pouco menor do que a largura de um ôlho neste aspecto; de perfil, os olhos avançam francamente na face dorsal da cabeça e apenas atingem a face ventral.

Olhos grandes e salientes. *Jugae* elevadas e de ápice arredondado. *Genae* largas e achatadas, com ápice arredondado. Rostro conforme fig. 10. Primeiro artículo antenal com poucas cerdas longas e 1,5 mm de comprimento.

Fig. 3 — *Zelurus camposi* sp. n., macho holótipo; fig. 4 — *Zelurus townsendi* sp. n., macho holótipo.

Pronoto com lóbulo anterior de convexidade pouco pronunciada, com processos discais constituídos por 1 + 1 pequenos espinhos, além de 1 + 1 processos laterais, apenas perceptíveis. Os ângulos ântero-laterais do pronoto são relativamente pronunciados, dirigidos para os lados e subagudos. O lóbulo posterior é rugoso, tem o sulco mediano longitudinal, que é a continuação do lóbulo anterior e 1 + 1 sulcos laterais menos aparentes; os ângulos humerais têm curto processo acuminado, de tamanho idêntico ao dos discais. No pronoto existem cerdas longas esparsas e pouco numerosas.

Processos prosternais curtos. Escutelo com longo processo apical espiniforme, tão longo quanto o comprimento do próprio corpo do escutelo, levantado levemente.

Patas com numerosas cerdas longas e finas. Fêmures dos 1.º e 2.º pares de patas percorridos, na face inferior, por duas fileiras de saliências dentiformes de tamanhos diferentes, maiores na metade distal. Tíbias serrilhadas na face inferior, as do 1.º par com fóssula esponjosa que mede de 1/4 a 1/3 do comprimento total.

Hemi-élitros apenas atingindo o ápice do abdômen.

Abdômen com cerdas longas e numerosas na face ventral, percorrido até o 6.º segmento inclusive pela carena ventral, no único exemplar que examinamos; dentículo do conexivo apenas perceptível, ao nível da sutura intersegmentar correspondendo ao 2.º urômero.

Material examinado — Macho holótipo, Posorja, Ecuador, F. Campos R. leg. (no I.O.C., Hem. N.º 1 298).*

A espécie é afim de *Zelurus martinsi* (C. Lima, 1940).

Zelurus townsendi sp. n.

(Figs. 4, 11 e 12)

Comprimento total (até o ápice dos hemi-élitros) — macho e fêmea 17 mm; largura máxima — (ao nível do tórax) 4 mm nos 2 sexos, (ao nível do abdômen) 5 mm nos 2 sexos.

Colorido geral prêto, com exceção de duas manchas vermelhas no cório dos hemi-élitros, uma alongada longitudinalmente, sub-basal, e outra menor, em curta faixa transversal e sub-apical, e das patas que são amarelo-claras e possuem anelações castanho-escuras no meio dos fêmures, no ápice dos fêmures e no ápice das tíbias.

Cabeça conforme figs. 11 e 12, com cerdas finas e longas, mais numerosas na região ante-ocular. Distância inter-ocular dorsal pouco menor do que a largura de um ôlho neste aspecto; de perfil, os olhos atingem a face dorsal da cabeça e estão levemente afastados da ventral. Olhos globosos e salientes. *Jugae* elevadas e sub-agudas. *Genae* largas, achatadas e de ápice arredondado. Rostro conforme fig. 12. Primeiro artículo antenal com poucas cerdas longas e 1,5 mm de comprimento; 2.º artículo com 4 mm e 3.º artículo com 3 mm.

Pronoto com lóbulo anterior de convexidade pouco pronunciada, com processos discais constituídos por 1 + 1 espinhos de tamanho mediano, além de 1 + 1 processos laterais constituídos por pequenos espinhos. Os ângulos ântero-laterais do pronoto são fortes, rombos e dirigidos para os lados. O lóbulo posterior é rugoso, mostra o sulco mediano ímpar e os 1 + 1 sulcos laterais; os ângulos humerais têm processo aguçado, não tão fortes, porém tão longos quanto os discais do lóbulo anterior. No pronoto existem cerdas longas, esparsas e pouco numerosas.

Processos prosternais nítidos. Escutelo com longo processo apical levemente levantado, de comprimento igual ao do corpo do próprio escutelo.

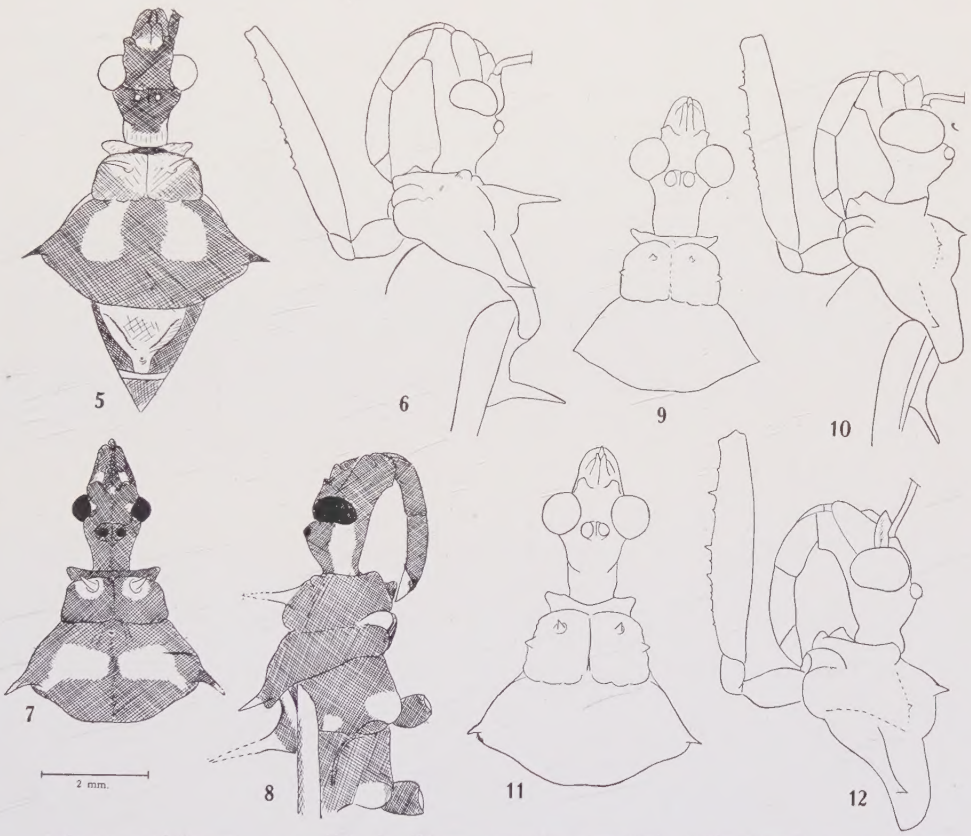
Patas com numerosas cerdas longas e finas. Fêmures dos 1.º e 2.º pares de patas percorridos, na face inferior, por duas fileiras de saliências dentiformes de tamanhos diferentes, maiores na metade distal.

* A abreviatura I.O.C., Hem. N.º..., indica a coleção hemipterológica aos cuidados do Dr. Herman Lent, no Instituto Oswaldo Cruz.

Tíbias serrilhadas na face inferior, as do 1.º par com fóssula esponjosa que mede 1/3 do comprimento total.

Hemi-élitros ultrapassando o ápice do abdômen no macho de cêrca de 1,5 mm, mas na fêmea deixando a descoberto a genitália.

Abdômen com cerdas longas e numerosas na face ventral, percorrido até o 6.º segmento inclusive no macho e em tôda a extensão na fêmea, pela carena ventral; dentículo do conexivo inaparente.



Zelurus breddini sp. n. — Fig. 5: Cabeça, pronoto e escutelo, vista dorsal; fig. 6: cabeça, tórax e pata I, de perfil. *Zelurus burmeisteri* sp. n — Fig. 7: Cabeça e pronoto, vista dorsal; fig. 8: cabeça e tórax, de perfil. *Zelurus camposi* sp. n. — Fig. 9: Cabeça e pronoto, vista dorsal; fig. 10: cabeça, tórax e pata I, de perfil. *Zelurus townsendi* sp n. — Fig. 11: Cabeça e pronoto, vista dorsal; fig. 12: cabeça, protórax e pata I, de perfil. (Tôdas as figuras na mesma escala).

Material examinado — Macho holótipo, Piura, Peru, C.H.T. Townsend coll. (no U. S. National Museum); fêmea alótipo, Trujillo, Peru, Weyrauch leg 20-III-1947 (no I.O. C., Hem. N.º 1 299).

Espécie muito próxima de *camposi,* anteriormente descrita, diferindo pelo aspecto das *jugae,* tamanho dos hemi-élitros e colorido das patas.

BIBLIOGRAFIA

COSTA LIMA, A.M., 1940, Sobre as especies de *Spiniger* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 35 (1): 1-123, figs. 1-17, ests. 1-10, figs. 1-71.

FRACKER, S.B. & BRUNER, S.C., 1924, Notes on some neotropical Reduviidae. *Ann. Ent. Soc. Amer.,* 17 (2): 163-174, fig. 1.

HUSSEY, R.F., 1953, Four new neotropical Reduviidae. *Proc. Ent. Soc. Wash.,* 55 (4): 196-205, figs. 1-2.

LENT, H. & WYGODZINSKY, P., 1947b, Notes on some assassin bugs of the genus *Zelurus* from the collections of the United States National Museum. *Proc. U. S. Nat. Mus.,* 97 (3217): 343-349, pls. 4-7, figs. 1-28.

LENT, H. & WYGODZINSKY, P., 1947c, Contribuição ao conhecimento dos *Reduviidae* americanos (Reduviidae, Hemiptera). *Rev. Brasil. Biol.,* 7 (3): 341-368, figs. 1-88.

LENT, H. & WYGODZINSKY, P., 1951a, Estudos sôbre o gênero *Zelurus* Hahn (Reduviidae, Hemiptera). *Rev. Brasil. Biol.,* 11(1):1-28, figs. 1-43.

LENT, H. & WYGODZINSKY, P. 1951b, Espécies do gênero *Zelurus* Hahn (Hemiptera, Reduviidae). *Rev. Brasil. Biol.,* 11 (2): 173-179, figs. 1-14.

LENT, H. & WYGODZINSKY, P., 1951c, Contribuição ao conhecimento de *Zelurus fulvomaculatus* (Berg. 1879) e sete outras espécies afins (Reduviidae, Hemiptera). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 49: 575-594, figs. 1-20.

SIGNORET, V., 1862, Description d'Hémiptères nouveaux de Yurimaguas et Moyabamba (Pérou). *Ann. Soc. Ent. France,* (4), 12: 579-588, pl. 15 figs. 1-11.